



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCELO SILVA FERREIRA

**ELETRODOS MODIFICADOS COM AGENTES BIOLÓGICOS
POR DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE IMOBILIZAÇÃO**

LONDRINA
2009

MARCELO SILVA FERREIRA

**ELETRODOS MODIFICADOS COM AGENTES BIOLÓGICOS
POR DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE IMOBILIZAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química dos Recursos Naturais, Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do grau em Mestre em Química dos Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia

LONDRINA

2009

*Aos meus pais, António César, Josefina
(Noti), por todo amor, respeito e confiança.
Aos meus irmãos Vivian, Cassiana e Thiago
pela amizade e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Um obrigado, mais que especial, a minha família, minhas tias, meus tios, primas e primos que sempre acreditaram em mim e me apoiaram de um modo ou de outro para me dedicar neste trabalho.

À minha noiva, Anne, que teve paciência durante todo o meu trabalho, e me apoiou em todos os momentos, com amor e carinho.

Ao professor Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia pela orientação e por todo ensinamento durante todo o trabalho, pela amizade e conselhos, meu imenso obrigado.

A empresa Novozimes, Curitiba PR, por ceder amostras da enzima Lacase.

Aos integrantes do LEMA, Analice, Arnaldo, Eduardo, Vitor e Danilo, por toda a ajuda no laboratório.

A Universidade Estadual de Londrina/Programa de Mestrado em Química dos Recursos Naturais pela disponibilidade de equipamentos e infraestrutura para a execução de toda a parte experimental.

Ao programa CNPQ; Fundação Araucária e a CAPES pelo suporte financeiro.

A minha avó Rosa e a minha tia Dorinha, *in memoriam*, saudade. Principalmente a Deus, pela proteção, paz e saúde.

GLOSSÁRIO DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

ABTS	(2,2- azino- bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
BTS	Exopolissacarídeo Botriosferana
BSA	Soro Albumina Bovina
EPC	Eletrodo de Pasta de Carbono
E_{pc}	Potencial de pico catódico
$E_{P,OX}$	Potencial de oxidação
E_{PRD}	Potencial de redução
EQMs	Eletrodos Quimicamente Modificados
FTO	(Óxido de Estanho Dopado com Flúor).
I_p	corrente de pico
I_{pa}	corrente de pico anódica
I_{pc}	corrente de pico catódica
$I_{E = 0,5V}/Ma$	Valor de corrente obtido com o potencial fixado em 0,5 V

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito da adição do mediador sobre a resposta amperométrica, para o I_{pc} , do sensor em diferentes valores de pH para o eletrólito. O agente biológico utilizado foi a enzima comercial do <i>Aspergillus oryzae</i>	49
Tabela 2 - Resultados obtidos, nos estudos das variáveis: quantidades de enzima e de pH do eletrólito. O agente biológico utilizado foi à enzima purificada do fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	55
Tabela 3 - Valores de potenciais de pico (E_{POX} , oxidação) e de corrente de pico ($j_{p,OX}$, oxidação) para os voltamogramas dos eletrodos, EPC/Ppy e EPC/Ppy/lacase, utilizando-se as soluções de ABTS, fenol e de KCl (eletrólito suporte).....	66
Tabela 4 - Valores de densidade de corrente de pico ($j_{P,OX}$, oxidação e j_{PRD} , redução) e dos potenciais de pico (E_{POX} , oxidação e E_{PRD} , redução) para os perfis voltamétricos em diferentes velocidades de varredura do eletrodo 1 (presença do agente biológico modificador, enzima lacase (NOVOZYM 51003®) em solução de 2 mmol L ⁻¹ de Benzoquinona em KCl 0,3 mol L ⁻¹ , pH 5,0	74
Tabela 5 - Valores de densidade de corrente de pico ($j_{p,ox}$, oxidação e $j_{p,rd}$, redução) e dos potenciais de pico (E_{POX} , oxidação e E_{PRD} , redução) para os perfis voltamétricos em diferentes velocidades de varredura do eletrodo 1 (presença do agente biológico modificador, enzima lacase (NOVOZYM 51003®) em solução de 2 mmol L ⁻¹ de Hidroquinona em KCl 0,3 mol L ⁻¹ , pH 5,0.....	75
Tabela 6 - Valores de potenciais de pico (E_{POX} , oxidação e E_{PRD} , redução) e de corrente de pico ($I_{P,OX}$, oxidação e I_{PRD} , redução) para os voltamogramas dos eletrodos (PDDA/AMIDOMILHO/PDDA/lacase) e (P D DA/A MIDOMANDIOCA/PDDA/lacase) em solução de KCl (0,1mol L ⁻¹) com ABTS (2 mmol.L ⁻¹)	85

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1** - Biossensor: Dispositivo que conecta um material biológico a um transdutor 14
- Figura 2** - Mecanismo: reação lacase e substrato.....26
- Figura 3** - Modelo do sítio catalítico da lacase de *Trametes versicolor* composto por quatro átomos de cobre. Tipo 1 (T1) o cobre confere uma típica coloração azul à proteína, onde ocorre a oxidação do substrato. Tipo 2 (T2) e 3 (T3) os átomos de cobre formam um conjunto onde ocorre a redução do oxigênio molecular a água.....28
- Figura 4** - Esquema dos principais métodos de imobilização do elemento biológico em biossensores29
- Figura 5** - Esquema indicando o efeito do mediador na catálise enzimática de uma lacase36
- Figura 6** - Diagrama representativo da oxidação do ABTS na presença de lacase (adaptado de MOROZOVA, *et. al.* 2007b).....37
- Figura 7** - Esquema do eletrodo de pasta de carbono modificado construído41
- Figura 8** - Representação esquemática do conjunto de equipamentos para realização de medidas de voltametria cíclica42
- Figura 9** - Foto da célula eletroquímica utilizada nas caracterizações. Em azul à direita se observa o eletrodo de referência Ag/AgCl (1), à esquerda se observa o contra eletrodo de platina (2) e ao centro o eletrodo de trabalho descrito (3).....43
- Figura 10** - Voltamograma cíclico do eletrodo de pasta de carbono (EPC) construído com grafite em pó (75% m.m) e nujol (25% m.m). Voltamograma obtido no eletrólito KCl (0,3 mol L⁻¹) com pH ajustado para 2,00. A velocidade de varredura foi de 20 mV s⁻¹.47
- Figura 11** - Voltamogramas cíclicos sobrepostos de eletrodos construídos com mediador (—) e sem mediador (- - -). Os eletrodos foram caracterizados no eletrólito (ABTS 2 mM+KCl 0,3 M) com pH ajustado para 2,00. O agente biológico utilizado foi a enzima comercial do fungo *Aspergillus oryzae* (NOVOZYM 51003® A velocidade de varredura foi de 20 mV s⁻¹48
- Figura 12** - Voltamogramas cíclicos para eletrodos de pasta de carbono com enzima lacase (Novozymes) imobilizada (50 nl), em solução de fenol (0,1 mol.L⁻¹) e KCl (0,3 mol.L⁻¹), v = 20 mV s⁻¹, em diferentes valores de pH: (—) 3,0; (—) 4,0; (—) 5,0; (—) 6,0; e, (—) 7,052

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos para eletrodos de pasta de carbono com enzima lacase (Novozymes) imobilizada (100 μ L), em solução de fenol (0,1 mol.L ⁻¹)M e KCl (0,3 mol.L ⁻¹), $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, em diferentes valores de pH: (—) 3,0; (—) 4,0; (—) 5,0; (—) 6,0; e, (—) 7,0	52
Figura 14 - Voltamogramas cíclicos para eletrodos de pasta de carbono com enzima lacase (Novozymes) imobilizada (150 nL), em solução de fenol (0,1 mol.L ⁻¹) e KCl (0,3 mol.L ⁻¹), $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, em diferentes valores de pH: (—) 3,0; (—) 4,0; (—) 5,0; (—) 6,0; e, (—) 7,0	52
Figura 15 - Voltamogramas cíclicos para eletrodos de pasta de carbono com enzima lacase (Novozymes) imobilizada (200 nL), em solução de fenol (0,1 mol.L ⁻¹)M e KCl (0,3 mol.L ⁻¹), $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, em diferentes valores de pH: (—) 3,0; (—) 4,0; (—) 5,0; (—) 6,0; e, (—) 7,0	53
Figura 16 - Valores da corrente (mA) em potencial igual a 0,5 V (Voltamogramas cíclicos) para eletrodo de pasta de carbono com diferentes quantidades de enzima imobilizadas em diferentes pH's.....	54
Figura 17 - Representação estrutural do pirrol (a) e do polipirrol (b).....	59
Figura 18 - Voltamogramas cíclicos para os eletrodos EPC/Ppy/lacase (a) e EPC/Ppy (b) obtidos apenas na presença de eletrólito suporte KCl (0,3 mol.L ⁻¹)	64
Figura 19 - Voltamogramas cíclicos para eletrodo EPC/Ppy/lacase, obtidos na presença de ABTS (2 mmol.L ⁻¹) e fenol (2mmol.L ⁻¹) com velocidade de varredura de 20 mv.s ⁻¹ e eletrólito suporte KCl (0,3 mol L ⁻¹)65	
Figura 20 - Voltamogramas cíclicos para eletrodo EPC/Ppy, obtidos na presença de ABTS (2 mmol.L ⁻¹) e fenol (2mmol.L ⁻¹) com velocidade de varredura de 20 mv.s ⁻¹ e eletrólito suporte KCl (0,3 mol L ⁻¹)	66
Figura 21 - Voltamogramas cíclicos para eletrodo 1 (com enzima) e eletrodo 2 (sem enzima) de pasta de carbono, comparação dos voltamogramas em solução de fenol (0,2 mol.L ⁻¹) com KCl (0,3 mol.L ⁻¹), $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ 67	
Figura 22 - Voltamogramas cíclicos para eletrodo EPC/Ppy/lacase na presença de diferentes concentrações de fenol, utilizando-se KCl (0,3 mol.L ⁻¹) como eletrólito suporte, $v = 20 \text{ mV. s}^{-1}$	68
Figura 23 - Voltamogramas cíclicos, comparando a resposta do eletrodo EPC/Ppy/lacase em solução de benzoquinona (2mmol L ⁻¹) com KCl (0,3 mol.L ⁻¹) e de hidroquinona (2 mmol.L ⁻¹) com KCl (0,3 mol L ⁻¹), 20 mV.s ⁻¹	60

Figura 24- Voltamogramas cíclicos, do eletrodo EPC/Ppy/lacase em solução de benzoquinona (2 mmol L ⁻¹) com KCl (0,3 mol L ⁻¹), em diversos pHs	71
Figura 25 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo EPC/Ppy/lacase em solução de hidroquinona (2 mmol L ⁻¹) com KCl (0,3 mol L ⁻¹), em diversos pHs	71
Figura 26 - Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura entre 2 e 1000 mV.s ⁻¹ utilizando o eletrodo em solução de Hidroquinona (2 mmol L ⁻¹) com KCl (0,3 mol L ⁻¹), pH 5,0.....	72
Figura 27 - Voltamogramas obtidos em diferentes velocidades de varredura entre 2 e 1000 mV.s ⁻¹ utilizando o biossensor em solução de Benzoquinona (2 mmol L ⁻¹) com KCl (0,3 mol L ⁻¹), pH 5,0	73
Figura 28 - Raiz quadrada da velocidade de varredura (v) e a densidade de corrente dos picos (I _p) de oxidação e redução para o eletrodo EPC/Ppy/lacase em solução de 2 mmol.L ⁻¹ de benzoquinona com KCl 0,3 mol.L ⁻¹ , pH = 5,0	76
Figura 29 - Valores de log (v) versus log (I _p) para picos de oxidação (■) e picos de redução para o EPC/Ppy/lacase na presença de benzoquinona (•)	77
Figura 30 - Ilustração esquemática do método de automontagem via adsorção eletrostática indicando as etapas de: 1) deposição do polication, 2) lavagem e secagem do suporte contendo uma camada de polication, 3) deposição do poliânion e 4) contendo camadas alternadas de polication e polianion	80
Figura 31 - Representação esquemática do processo de fabricação de filmes nanoestruturados por automontagem utilizando dois polieletrólitos, Lacase e PDDA	82
Figura 32 - Representação esquemática do processo de fabricação de filmes nanoestruturados por automontagem utilizando polieletrólitos, Lacase, amido de milho e PDDA.....	83
Figura 33 - Voltamogramas cíclicos, lâmina de FTO, (PDDA/lacase) e na presença de amidos de milho e mandioca (P D DA/A MIDOMILHO/PD DA/lacase) e (PDDA/AMIDOMANDIOCA/PDDA/lacase) em solução de KCl 0,1 mol.L ⁻¹ com ABTS 0,2 mol.L ⁻¹ , v = 20 mv s ⁻¹	83

FERREIRA, Marcelo Silva. **Construção de eletrodos modificados com agentes biológicos para imobilização da lacase.** 2009. 90 fls. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Um biossensor de pasta de carbono modificado com enzima lacase de extrato bruto de *Aspergillus oryzae* do produto Novozym 51003 foi proposto. Essa enzima catalisa a oxidação de diferentes tipos de fenóis, aminas e ligninas acopladas no oxigênio da molécula e esta entre as mais aplicadas na construção de biossensores amperométricos. O efeito da concentração de lacase foi estudado aplicando-se 50^μL, 100 nL, 150 μL e 200 nL do produto Novozym 51003 na mistura de pasta de carbono formada por 75% (m/m) de pó de grafite e 25 % (m/m) de nujol. A influência de um mediador, o ABTS (2,2- azino- bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) e o pH foram avaliados. Como suporte para imobilização do agente modificador utilizou-se seringas de plástico de 1 mL (seringas clínicas para insulina), modificadas com um fio de cobre acoplado ao embolo ligado, para o contato elétrico externo, a uma seção de grafite, o efeito de um polímero condutor, o pirrol, também foi avaliado. Outra técnica de imobilização utilizada neste trabalho foi a *Layer by Layer*, tratam-se de uma automontagem de filmes, para esta etapa utilizou-se, placas de FTO (*Oxido de Estanho dopado com Flúor, Flexitec*) como suporte. Os filmes poliméricos oferecem a vantagem de proteger a superfície do sensor contra impurezas, bloquear interferentes e permitir alta velocidade de transferência de elétrons. Os materiais utilizados, além da enzima lacase (NOVOZYM 51003) e do eletrólito PDDA (*poly(diallyldimethylammonium chloride)*), foram amidos de milho e mandioca. Parâmetros como pH e velocidade de varredura foram avaliados nesta etapa e demonstraram que para o eletrodo construído com a enzima imobilizada de acordo com a configuração PDDA/AMIDOMANDIOCA/PDDA/LACASE houve melhor resposta em consequência de uma melhor estabilidade da enzima no eletrodo.

Palavras-Chave: Eletrodos modificados. Lacase. Pasta de carbono. Amido, Filmes automontados.

FERREIRA, Marcelo Silva. **Construção de eletrodos modificados com agentes biológicos para imobilização da laccase**. 2009. 90 fls. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

A carbon paste electrode modified with enzyme laccase product Novozym 51.003 has been proposed in this manuscript. This enzyme catalyzes the oxidation of different types of phenols compounds, and lignin amine functional groups engaged. This enzyme has been among the most applied in the construction of biosensor amperometric Electrical. The effect of laccase amounts added on the carbon paste was studied using 50^μL, 100 nL, 150 nL e 200 nL of the product Novozym 51.003 i. The mixture of carbon paste was composed by 75% (m/m) of the graphite and 25% (m/m) nujol. The mediator ABTS (salt diamine of 2,2- azino- bis (3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid) influence and pH were also evaluated. As support to immobilize modifying agent was used syringes plastic 1 mL (syringes Nicas to insulin), adapted with a copper wire attached to the piston connected to the contact externally with graphite rod. Another technique use to immobilized enzyme was *Layer by Layer*. In this step was used, FTO glasses (tin oxide doped with Fluor, Flexitec) as support. The materials used were laccase enzyme (Novozym 51003); polyelectrolytes PDDA (poly (diallyldimethylammonium chloride) and different sources of starch: corn and cassava. Parameters such as pH and scan rate were studied at this stage and demonstrated that for the electrode construction of the immobilized enzyme according to the set PDDA/CASSAVASTARCH/PDDA/LACCASE was the most higher response and the better electrode stability.

key words: Modified electrodes. Laccase. Carbon paste. Starch. Self assemblies films.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1 ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO	18
1.1.1 Modificação com Enzimas	22
1.2 LACASE (P-DIFENOL: OXIGENOXIREDUCTASE; E.C.1.10.3.2)	25
1.3 TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO	28
1.3.1 Adsorção	29
1.3.2 Ligação Covalente	30
1.3.3 Ligação Covalente Cruzada	30
1.3.4 Filmes ou Matrizes Poliméricas (os)	31
CAPÍTULO 2 - CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSOR COM LACASE DE ASPERGILLUS ORIZAE (NOVOZYM 51003®) IMOBILIZADA EM PASTA DE CARBONO	33
2.1 INTRODUÇÃO	33
2.2 PARTES EXPERIMENTAL	38
2.2.1 Reagentes e Soluções	38
2.2.1.1 Solução de cloreto de potássio	38
2.2.1.2 Solução de ABTS (2,2- azino- bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)	39
2.2.1.3 Solução de fenol	39
2.2.1.4 Obtenção da enzima purificada do fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	39
2.2.2 Determinação da Atividade Enzimática da Lacase	39
2.2.3 Preparação dos eletrodos de Pasta de Carbono	40
2.2.4 Medidas Voltamétricas (Caracterização Eletroquímica)	42
2.2.4.1 Célula voltamétrica	43
2.2.5 Efeito do Mediador	44
2.2.6 Estudos da Quantidade de Enzima	45
2.2.7 Estudo da Influência do pH	45
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
2.3.1 Avaliação da Atividade da Lacase (NOVOZYM 51003®)	46

2.3.2 Efeito do Mediador para eletrodos Construídos com Lacase do <i>Aspergillus Oryzae</i> (NOVOZYM 51003®).....	46
2.3.3 Efeito da adição de concentrações de lacase e de diferentes valores de pH na resposta do eletrodo de pasta de carbono	50
2.4 CONCLUSÕES PARCIAIS	57

CAPÍTULO 3 - ELETRODOS MODIFICADOS UTILIZANDO FILMES

POLIMÉRICOS (AS) PARA IMOBILIZAÇÃO DE AGENTES BIOLÓGICOS.....	58
3.1 INTRODUÇÃO	58
3.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	61
3.2.1 Reagentes e Soluções.....	61
3.2.1.1 Produção do exopolissacarídeo (EPS).....	61
3.2.1.2 Preparo das soluções	62
3.2.1.3 Construção dos eletrodos de pasta de carbono	62
3.2.2 Estudo da Velocidade de Varredura	63
3.3 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	64
3.3.1 Efeito da Presença do Modificador nos Eletrodos Utilizando como Substratos Soluções de ABTS e Fenol.....	64
3.3.2 Efeito da Presença do Modificador nos Eletrodos Utilizando como Substratos Soluções de Hidroquinona e Benzoquinona	68
3.3.3 Estudo da Influencia do pH.....	70
3.3.4 Efeito da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica do eletrodo modificado.....	72
3.4 CONCLUSÕES PARCIAIS	77

CAPÍTULO 4 - EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE AMIDO NA ESTABILIZAÇÃO DE ELETRODOS MODIFICADOS COM LACASE UTILIZANDO A TÉCNICA DE "LAYER BY LAYER" (LBL)

UTILIZANDO A TÉCNICA DE "LAYER BY LAYER" (LBL)	79
4.1 INTRODUÇÃO	79
4.2 PARTE EXPERIMENTAL	81
4.2.1 Soluções para Deposição dos Filmes	81
4.2.2 Eletrólitos.....	81
4.2.3 Deposição dos Eletrodos.....	82
4.3 TESTES ELETROQUÍMICOS	83

4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	86
CONCLUSÕES GERAIS	87
REFERENCIAS.....	89

INTRODUÇÃO

Devido à grande necessidade de identificação e quantificação de metabólitos de diferentes fontes como, por exemplo: amostras clínicas, amostras de alimentos e principalmente ambientais, a química analítica concentrou estudos que buscavam novos mecanismos de análises que fossem rápidos, eficientes, simples e relativamente de baixo custo.

Segundo a IUPAC (THÉVENOT *et al.*, 2001 apud ANDRADE, 2006), os biossensores são um subgrupo de sensores químicos que são capazes de proporcionar informação analítica quantitativa ou semi-quantitativa, usando um elemento de reconhecimento biológico com a sensibilidade de um transdutor para converter o sinal proporcional à concentração do analito.

Estes dispositivos foram criados inicialmente na década de 60, mais precisamente em 1962 onde dois cientistas, Clarck e Lyons integraram uma enzima a um eletrodo para a determinação de glicose em amostras de sangue. O dispositivo apresentou ser uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas tradicionais de análises como a cromatografia e a espectrofotometria (JAROSZ-WILKOLASKA, RUZGAS, GORTON, 2004), devido as suas características peculiares, tais como: especificidade, sensibilidade, seletividade, resposta rápida, baixo custo de produção, estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento “*on site*” rápido (AMINE, 2004).

A utilização de moléculas com atividade biológica tem contribuído sensivelmente para o desenvolvimento dos biossensores (ROSSATO, 2001). Entre os elementos biológicos mais empregados na construção de biossensores, as enzimas são as que mais se destacam, podendo ser utilizadas na sua forma purificada, ou em estado bruto, podendo estar presentes em microorganismos ou em porções de tecido animal ou vegetal (FATIBELLO FILHO; BARBOSA; LEITE, 2003).

Dentre as partes que constituem os biossensores tal como observado na Figura 1, os transdutores estão conectados aos elementos biológicos e tem a função de converter o sinal químico da reação de interesse, mais especificamente em presença do analito de interesse em outro sinal mensurável acusando a concentração do analito na amostra. Dentre os transdutores mais utilizados, os do tipo eletroquímicos têm sido amplamente empregados na construção dos biossensores (ROSSATO *et al.*, 2001).

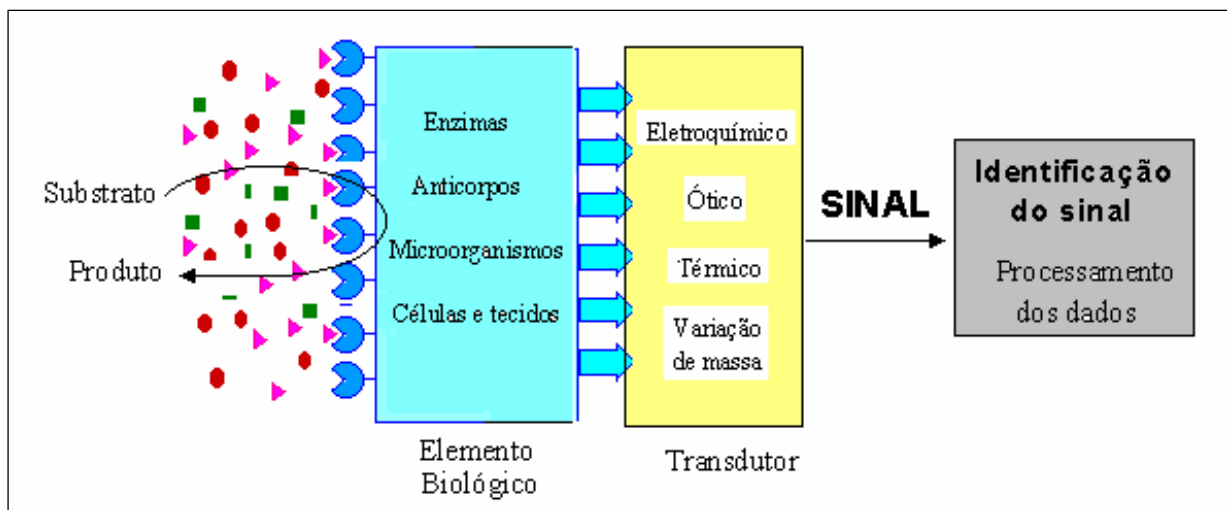


Figura 1: Biossensor: Dispositivo que conecta um material biológico a um transdutor.

Eletrodos quimicamente modificados (EQMs) são bastante apropriados para o desenvolvimento de biossensores, gerando transdutores eficientes. Basicamente um EQM consiste de duas partes: um eletrodo base e uma camada de modificador químico. Os eletrodos, neste caso, são tratados com algum reagente, modificando as propriedades superficiais do eletrodo com algum interesse específico, aumentando a sensibilidade ou seletividade do mesmo. O termo eletrodo quimicamente modificado foi utilizado na década de 70 por Murray e colaboradores (apud PEREIRA; SANTANA; KUBOTA; 2002) que imobilizaram um agente modificador na superfície de eletrodos convencionais e apresentaram características físico-químicas alteradas em termos de reatividade e seletividade. Dentre os materiais de eletrodo que podem ser usados na construção de biossensores, eletrodos a base de carbono são os mais utilizados devido

às várias vantagens que oferecem tais como: baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo e ampla janela de potencial em solução aquosa.

O primeiro eletrodo de pasta de carbono (EPC) foi desenvolvido em 1958 por Adams (FATIBELLO FILHO; BARBOSA; LEITE, 2003), na tentativa de preparar um eletrodo de carbono renovável e que pudesse ser usado em uma ampla faixa de potencial positivo, na qual o eletrodo de mercúrio metálico não fosse aplicável.

As enzimas são freqüentemente utilizadas como agentes modificadores de eletrodo, imobilizadas em pasta de carbono, oferecem vantagens tais como: facilidade de preparação, baixo custo e estabilidade (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

A etapa da imobilização do componente biológico tem sido uma etapa crítica no desenvolvimento de biossensores, devido à necessidade dos biocomponentes, quando imobilizados, necessitarem reter a maior parte de sua atividade biológica para uma boa sensibilidade do biossensor. Assim, técnicas de imobilização, como por exemplo, formação de filmes poliméricos para proteção do agente modificador e utilização de espécies mediadoras são de grande potencial para o desenvolvimento dos biossensores. Desta forma existem várias configurações para os mesmo que vem encontrando inúmeras aplicações (FREIRE; DURAN; KUBOTA, 2001).

Neste contexto, o presente trabalho vem discutir a construção de eletrodos com a enzima lacase imobilizada em diferentes formas: em pasta de carbono, filmes poliméricos e pela adsorção física/química (camadas automontadas). O efeito da adição de um mediador, no caso o ABTS (2,2- azino- bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) aos eletrodos estudados também foram pesquisados através do comportamento eletroquímico (voltamétrico) do eletrodo.

Os mediadores têm a função de participar no processo redox da atividade enzimática atuando como uma “ponte de elétrons”, podendo ser oxidado pela enzima e reduzido pelo substrato antes de retornar ao seu estado inicial. Este conteúdo esta descrito no segundo capítulo do trabalho que também descreve o estudo da influência do pH e da quantidade de enzima na resposta eletroquímica dos eletrodos de pasta de carbono com o material biológico imobilizado.

A voltametria cíclica foi à técnica utilizada para avaliação eletroquímica dos eletrodos construídos com a enzima Lacase imobilizada através de filmes poliméricos. A imobilização de policamadas da espécie ativa na superfície do eletrodo tem sido empregada no desenvolvimento de sensores com o objetivo de ampliar sua resposta eletroquímica (MATTOSO; OLIVEIRA; PATERNO, 2001). Este conteúdo, relativos à imobilização de material biológico em filmes poliméricos, está descrito em dois capítulos. O capítulo 3 traz a formação dos filmes através do uso do polipirrol como agente modificador, e o capítulo 4 traz a formação de filmes automontados através da técnica de “*Layer-by-Layer*” (LbL).

O capítulo 3 trata da resposta eletroquímica de eletrodos de pasta de carbono, sendo a enzima Lacase (NOVOZYM 51003[®]) imobilizada através de filmes gerados pela adição de polipirrol como agente modificador em solução. O pirrol foi escolhido pelo caráter condutor, do filme de polímero formado a partir deste monômero, em um vasto intervalo de pH (1 a 14), melhorando a transferência de elétrons na catálise enzimática. Para melhor estabilização do eletrodo a enzima foi imobilizada na presença do exopolissacarídeo Botriosferana (BTS). Este polissacarídeo é uma goma solúvel em água e foi produzido pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* isolado de câncer de eucalipto por Barbosa, Dekker e St Hardy, (1996) no Laboratório de Pesquisa de Bioquímica de Microrganismos do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, de acordo com os procedimentos descritos na literatura (SILVA, 2007; DEKKER; BARBOSA, 2001) e gentilmente cedidos pela Professora Dra. Aneli de Melo Barbosa.

Outra técnica de formação de filmes automontados que tem recebido grande atenção pela sua facilidade e baixo custo de produção é aquela denominada de “*Layer-by-Layer*” (LbL) (DECHER; HONG, 1991). Os filmes são automontados por sobreposições de espécies com cargas efetivas opostas, as espécies usadas devem ser polieletrólitos e o material de interesse cujas atrações entre camadas se dão por pontes de hidrogênio e por atrações eletrostáticas (CHAI *et al.*, 2008). A construção do eletrodo com a enzima Lacase imobilizada utilizando esta técnica de filmes automontados esta descrita no Capítulo 4.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Construir eletrodos modificados utilizando-se a enzima Lacase (NOVOZYM 51003[®]) imobilizada por diferentes procedimentos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a adição de ABTS à pasta de grafite como mediador de atividade de lacase.
- Estudo do eletrodo modificado através da variação do pH do eletrólito e da quantidade de enzima.
- Imobilizar a enzima lacase utilizando o polímero condutor, pirrol, como agente modificador em solução, para imobilização da lacase.
- Imobilizar a Lacase através da técnica de automontagem “*layer by layer*” (LbL) utilizando-se diferentes fontes de amidos, em suporte rígido lâmina de FTO (óxido de estanho dopado com flúor).

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO

Estudos envolvendo eletrodos modificados são relatados na literatura desde o começo do século XX, quando Kucera em 1903 propôs um eletrodo de mercúrio metálico. O eletrodo apresentado teve sua utilidade limitada devido ao bloqueio gradual da superfície e pela adsorção de interferentes, gerados durante os processos eletroquímicos. Desde então as pesquisas para desenvolvimentos de novos materiais eletródicos a base de carbono se intensificaram (BARD; FAULKNER, 2000).

Em 1958, foi desenvolvido por Adams o primeiro eletrodo de pasta de carbono (EPC) na tentativa de preparar um eletrodo de carbono renovável e que pudesse ser usado em uma ampla faixa de potencial positivo, embora seus experimentos não tivessem obtidos resultados satisfatórios, em relação à operação do eletrodo, concluiu-se que a mistura de pasta de carbono tinha apresentado propriedades eletródicas promissoras (VIEIRA; LUPETTI; FATIBELLO FILHO, 2003).

Desde então os eletrodos de pasta de carbono foram intensamente explorados como uma alternativa viável a produção de eletrodos modificados. Os eletrodos preparados à base de pasta de carbono apresentam vantagens, tais como baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo e ampla janela de potencial em solução aquosa, o que justifica sua extensa utilização como eletrodo de trabalho em uma série de aplicações eletroquímicas como: *saúde* (testes rápidos para dosagem de glicose, uréia, com uso em unidades de terapia intensiva, laboratórios clínicos), *indústria alimentícia* (analisadores de composição de alimentos, teor de contaminação microbiana, concentração de vitaminas, corantes etc.) e *monitoração ambiental* (uso em tratamento de águas, resíduos industriais e gases poluentes, concentrações de substâncias como fenóis, pesticidas, metais pesados) (VISWANATAM *et al.*, 2009;

TECON; VAN DER MEER, 2008; SEIDEL; NIESSNER, 2008; WANEKAYA; CHEN; MULCHANDANI, 2008).

A pasta de carbono é constituída por uma mistura de pó de grafite e um agente aglutinante. O pó de grafite possui baixo custo, baixa capacidade de adsorção de oxigênio e impurezas eletroativas. Existem varias formas de materiais carbonáceos, que são apropriados para aplicações eletroanalíticas, dentre eles os mais utilizáveis são: pasta de carbono, carbono vítreo, grafite pirolítico e nanotubos (AHUJA *et al.*, 2007; JUNFENG *et al.*, 2006). O óleo vegetal também deve possuir características determinadas, como ser eletroinativo, quimicamente inerte, imiscível em água, apresentar baixo teor de impurezas, e ser pouco volátil. Sob essas condições o componente não condutor é capaz de exercer sua função de conferir consistência a mistura e preencher os interstícios entre os grãos de grafite. Entre os agentes aglutinantes, Nujol; Uvasol; Parafina; Bromonaftaleno são bastante empregados (AHAMMAD; LEE; RAHMAN, 2009; ZIMA *et al.*, 2009). Wang e Naser *et al.* (apud OLIVEIRA, 2004) prepararam eletrodos compósitos carbono/parafina, incorporando quantidades apropriadas de modificadores na mistura parafina fundida/pó de grafite e sua posterior solidificação, resultando em uma dispersão homogênea do modificador e numa superfície mecanicamente rígida. A compatibilidade de diferentes modificadores com o eletrodo foi acompanhada por voltametria cíclica.

A mistura dos componentes grafite em pó e óleo orgânico (agente aglutinante) resultava num material compósito, segundo Talman e Petersen (1990) constituído por pelo menos uma fase condutora e pelo menos uma fase isolante. A simplicidade na sua preparação permite desenvolver eletrodos de várias formas e tamanhos diferentes e a incorporação de uma variedade de modificadores. A seguir é apresentada uma pesquisa bibliográfica sobre o desenvolvimento e aplicação eletroquímica sobre eletrodos de pasta de carbono modificadas com agentes químicos, evidenciando que estes apresentam vantagens em relação aos eletrodos de pasta com aglutinantes líquidos possibilitando maior sensibilidade nos limites de detecção.

Sanmantias *et al.* (apud OLIVEIRA, 2004) propuseram um eletrodo compósito de grafite/polímeros sobre uma superfície de óxido de estanho dopado com índio (ITO) que pôde ser modificado com filmes de Nailon contendo uma pequena

quantidade de substâncias eletroativas dispersadas, tal como as ftaloacianinas, com resposta eletroquímica. Os resultados foram demonstrados em dados de voltametria mostrando que a dispersão do metilviologênio no Náilon facilita o transporte eletrônico através da membrana.

Klatt *et al.* (apud OLIVEIRA, 2004) desenvolveu um eletrodo de grafite/teflon para caracterização voltamétrica. O autor propôs que com esse procedimento o eletrodo poderia conservar a capacidade de moldagem e eliminar a dissolução podendo ser usados em solventes não aquosos. Várias composições de grafite/teflon foram preparadas mostrando que as de maior composição apresentam maior resistência mecânica, mas alta resistência ôhmica.

Fernandez *et al.* (apud OLIVEIRA, 2004) descreveram a aplicação de eletrodo compósito a base de grafite/poli (tetrafluoretileno), na detecção amperométrica da oxidação de herbicidas Tiram e Disulfuram respectivamente. Limites de $4,3 \cdot 10^{-8}$ e $2,0 \cdot 10^{-8}$ mol. L⁻¹ foram encontrados para Tiran e Disulfuran respectivamente.

Os eletrodos compósitos citados tiveram ótimas respostas eletroquímicas, mas apresentaram dificuldades em relação à reprodutibilidade de superfície (TALMAN E PETERSEN, 1990). A pasta de grafite é capaz de imobilizar outros agentes modificadores, como por exemplo, as enzimas, que podem ser imobilizadas na forma pura ou em extrato bruto de tecidos e microorganismos que a contenham (LEITE, FATIBELLO-FILHO, BARBOSA, 2003).

Gil *et al* (2008) desenvolveram biossensores de pasta de carbono modificados com lacase utilizando-se de extrato enzimático bruto obtido de culturas do fungo *Pycnoporus sanguineus*. Os autores avaliaram o efeito do emprego de biopolímeros com soro albumina bovina (BSA) e do glutaraldeído no desempenho do biossensor. Os resultados obtidos demonstraram boa resposta do biossensor para vários compostos fenólicos de interesse comercial e ambiental em pH neutro e em diferentes meios.

Vieira, Lupetti e Fatibello-Filho (2003) construíram um eletrodo de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha, fonte da enzima peroxidase (POD: EC 1.11.1.7) e o utilizaram para determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos. O biossensor apresentou um bom desempenho analítico e um tempo de

vida superior a 7 meses. Os resultados obtidos com o biossensor para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas apresentaram concordância a um nível de confiança de 95% em relação a um procedimento da Farmacopéia americana.

Kubota *et al.* (1999 apud SOARES, 2001) descreveram a imobilização de Peroxidase de Horseradish sobre sílica gel modificada com óxido de titânio e seu uso no desenvolvimento de um biossensor a base de pasta de carbono. O biossensor mostrou um intervalo de resposta linear entre 10 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fenol, com um tempo de resposta de 3 s.

Freire, Durán e Kubota (2001), construíram um eletrodo de pasta de carbono modificados com lacase utilizando-se de extrato enzimático bruto de *Trametes versicolor* para detecção de compostos fenólicos. Os autores observaram bons resultados de detecção quando utilizaram eletrodos constituídos de fibras de carbono e lacase imobilizada covalentemente com carbodiimida e glutaraldeído.

O desempenho dos eletrodos de pasta de carbono modificados com enzimas foi substancialmente melhorado. A imobilização de enzimas nas pastas de carbono como agentes modificadores de superfície vem aumentar a sensibilidade dos eletrodos melhorando sua reprodutibilidade e ampliar seu campo de atuação. No caso da enzima lacase que possui especificidade de catalise para compostos aromáticos, especialmente compostos fenólicos, vários biossensores já foram desenvolvidos com a finalidade de monitorar efluentes industriais oriundos principalmente das atividades de produção de plásticos, tintas, corantes, drogas, antioxidantes, polímeros sintéticos, resinas, detergentes e desinfetantes.

Outras referências sobre a preparação de eletrodos modificados estão incluídas no próximo item, que descreve o desenvolvimento dos eletrodos construídos com a aplicação de lacases como modificadores.

1.1.1 Modificação com enzimas

A utilização de moléculas com atividade biológica em metodologias analíticas evoluiu sensivelmente nos últimos anos e atualmente a aplicação destas em eletrodos modificados com pasta de carbono traz uma grande variedade de configurações desses instrumentos (ZIMA *et al.*, 2009).

Devido a suas propriedades de especificidade de catalisação e alta sensibilidade, as enzimas, catalisadores protéicos das reações bioquímicas, são utilizadas como modificadores de pasta de carbono, e podem ser usadas na forma pura ou pela imobilização de microorganismos ou tecidos que contenham a enzima requerida. A atividade catalítica da enzima proporciona um meio sensível e específico para sua própria mensuração, dessa maneira, eletrodos a base de pasta de grafite tem sido utilizados amplamente, principalmente devido o fato dos mesmos serem capazes de não só de imobilizar enzimas, mas também ligantes mediadores de redox, tecidos biológicos e de catalisar processos de óxido-redução de compostos envolvidos em reações enzimáticas. (LEITE; FATIBELLO FILHO; BARBOSA, 2003).

Durante as últimas décadas, muito conhecimento tem sido formulado a respeito das propriedades catalíticas das enzimas, assim vários artigos científicos foram publicados destacando aplicações destes biocatalisadores em vários setores produtivos, dentre os que destacam a produção de cerveja, produtos alimentícios, farmacêuticos, cosméticos e de limpeza, entretanto, dentro do tema em questão, procurou-se tratar do uso de enzimas como agente modificadores de eletrodos de pasta de carbono (MEIER; BURKAT, 2009; RODRIGUEZ *et al.*, 2009; GOGATE; KABADI, 2009; WILLNER *et al.*, 2009).

A idéia inicial de integrar uma enzima a um eletrodo ocorreu em 1962, quando dois cientistas, Clark e Lyons, imobilizaram a enzima Glicose oxidase, e utilizaram o dispositivo na determinação de glicose em amostras de sangue. O dispositivo foi denominado inicialmente de “eletrodo enzimático”, mas como consequência dos avanços nos estudos envolvendo sensores e enzimas houve necessidade de um termo que fosse mais genérico e abrangente, quando passaram a

ser denominados de biossensores (apud SADIK; ALUOCH; ZHOU, 2009; SARMA *et al.*, 2009).

Desde então, o desenvolvimento dos eletrodos de pasta de carbono modificados com enzimas foi intensamente explorado, a pasta de carbono apresentava-se de fácil preparação além do baixo custo, a imobilização das enzimas em suporte insolúvel teve sua estabilidade facilitando o uso em análises químicas e tais eletrodos apresentavam como características, a vantagem de diminuir o limite de detecção do analito de interesse e aumentar a seletividade das determinações.

Dentre as enzimas mais utilizadas em biossensores, estão as oxidorreduções, tais como: Glicose oxidase (BANKAR *et al.*, 2009), Peroxidase de Horseradish (PRAKASH; YOGESWARAN; CHEN, 2009), Urease (KRAJEWSKA, 2009a), Cholesterol oxidase (ARYA; DATTA ; MALHOTRA, 2008), Tirosinase (JAFFREZIC-RENAULT, 2008), Lacase ((WIDSTEN; KANDELBAUER, 2007) entre outras (LEITE; FATIBELLO FILHO; BARBOSA, 2003; VIEIRA; LUPETTI; FATIBELLO FILHO, 2003).

O desenvolvimento dos eletrodos modificados com enzimas é amplamente divulgado na literatura, da pesquisa bibliográfica que foi feita, para este tema, procurou-se focalizar eletrodos que fossem modificados com a lacase, visto que, esta foi à enzima utilizada no trabalho.

Kochana *et al.* (2008) desenvolveram um biossensor bienzimático a base de lacase e tirosinase imobilizadas em matriz de gel de titânia para determinação amperométrica de compostos fenólicos. O biossensor obtido foi utilizado com sucesso para determinação de 2,6 – dimetoxifenol, 4-tertibutilcatecol, 3-clorofenol e catecol. A mais alta sensibilidade e ampla faxia linear foi observada para catecol, $234 \text{ mA mol.L}^{-1}$ e $2.10^{-7} - 3,2.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente.

Jarosz-Wilkolazka *et al.* (2004) construíram eletrodos com a enzima lacase de *Coriolo unicolor* imobilizada em pasta de carbono pelo método de adsorção física. Os eletrodos foram testados para detecção de polifenóis. Os eletrodos modificados apresentaram diferentes sensibilidades para diferentes compostos, mas os autores demonstraram que apenas a adsorção da enzima no grafite é suficiente para obtenção de medidas simples de polifenóis em solução.

Vianello *et al.* (2004) desenvolveram um biossensor de ouro revestido com uma monocamada da enzima lacase do *Rigidoporus lignosus*, para determinação de fenóis em óleos vegetais. Os autores obtiveram um limite de detecção $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de hidroquinona caracterizando a célula eletroquímica e a atividade da enzima por medidas amperométricas de soluções de 1,4- benzoquinona como substância eletroativa.

Fatibello Filho, Leite e Barbosa (2003) construíram um eletrodo de pasta de carbono modificada com extrato bruto enzimático do fungo *Pleurotus ostreatus* como fonte de lacase e o utilizaram para a determinação de adrenalina e dopamina em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos com o biossensor para a determinação dessas catecolaminas em formulações farmacêuticas apresentaram concordância a um nível de confiança de 95% em relação a um procedimento da Farmacopéia americana.

A imobilização de enzimas como modificadores de pasta de carbono pode ser efetuada através de diferentes procedimentos e utilizando diferentes materiais como suporte. A pasta de carbono apresenta-se de fácil preparação e baixo custo. A enzima imobilizada em suporte insolúvel oferece maior estabilidade aumentando seu uso em análises química. Os eletrodos de pasta de carbono modificada ainda apresentam como vantagens, baixa corrente de fundo, superfície facilmente renovada, facilidade de preparação e ampla faixa de potencial de trabalho.

Os trabalhos acima representam alguns exemplos do uso de enzimas na construção de biossensores, entretanto, a literatura traz muito mais informações. Visto que, a enzima Lacase foi a enzima utilizada nesse trabalho, o tópico a seguir vem trazer informações desta enzima bem como a sua importância e aplicação em biossensores.

1.2 LACASE (*P-DIFENOL: OXIGENOXIREDUCTASE; E.C.1.10.3.2*)

Lacases (*p*-difenol: oxigenoxireductase; E.C.1.10.3.2) são enzimas que catalisam a oxidação de diferentes tipos de fenóis, aminas e ligninas acopladas no oxigênio da molécula (ROSSATO, 2001), as aplicações de lacases são muito amplas, tendo utilização no setor de papel e celulose (como bioclareador, potencial substituta do cloro, que é ambientalmente nocivo devido à geração de compostos clorados altamente tóxicos); no tratamento de efluentes para remoção de compostos poli-fenólicos ou descoloração de água de efluente industrial, principalmente do setor têxtil, em relação a sensores químicos, estão entre as mais empregadas na construção de biossensores amperométricos (WIDSTEN; KANDELBAUER, 2007; COUTO; HERRERA, 2006).

Esta enzima está amplamente distribuída na natureza, sintetizada por várias plantas, bactérias, fungos e até por algumas espécies de insetos (PIOTTO, 2003) as pesquisas com a enzima lacase tem sido intensas e muito tem se descoberto sobre sua diversidade e utilidades (DURÁN, 2002).

Lacases produzidas por fungos isolados na natureza têm sido estudadas para utilização em diferentes processos biotecnológicos de biorremediação de xenobióticos (WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003) na detecção e tratamento de poluentes fenólicos na forma de biossensores (ROSSATO *et al.*, 2001; FREIRE; DURAN; KUBOTA, 2001; GOMES; REBELO, 2003; QUAN; SHIN, 2004).

As Lacases contêm quatro íons metálicos classificados em três tipos (T1, T2, T3, e.g) de acordo com suas características do espectro, são chamadas de cuproproteínas azuis, cuproxidases azuis ou ainda oxidases azuis. Outras enzimas que fazem parte desse grupo são a ascorbato oxidase, a ceruloplasmina, e a fenoxazinona. O ciclo catalítico desta enzima compreende as etapas de redução do cobre tipo 1 (aceptor primário de elétrons) pelo substrato (analito), transferência eletrônica interna do cobre tipo 1 para os átomos de cobre T2 e T3 e por fim a interação destes com o oxigênio molecular. Os quatro átomos de cobre diferem entre si por seu número de oxidação (tipo 1, 2 e 3) (ROSSATO, 2001).

Neste processo, um único elétron é removido do grupo hidroxila do fenol, para formar radicais fenoxila, simultaneamente com a redução do oxigênio molecular à água. A Figura 2 mostra um esquema da atuação da enzima em um substrato, de maneira genérica.

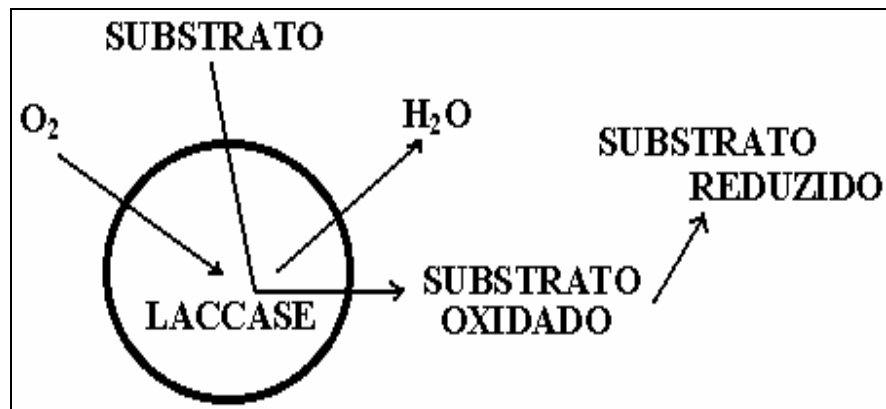


Figura 2 - Mecanismo: reação laccase e substrato.

Fonte: (JAROSZ-WILKOLAZKA; RUZGAS; GORTON, 2004).

A redução do oxigênio molecular para a água ocorre graças à interação com os íons cobre da estrutura da enzima com o substrato específico; as enzimas degradam compostos fenólicos, podendo catalisar quatro moléculas de substratos concomitantemente com a redução de quatro moléculas de oxigênio molecular a água, além de gerar produto oxidado (quinona). A aplicação de um potencial no meio onde ocorre a reação de catalise pode regenerar a enzima novamente ao seu estado oxidado e assim continuar atuando na atividade de reconhecimento.

Existe ainda um ultimo grupo de especial interesse em biotecnologia e.g. Enquanto a catálise no centro cobre T1 é razoavelmente bem compreendida, a descrição detalhada dos eventos catalíticos que ocorrem na região de redução do oxigênio molecular, região do cluster de três átomos de cobre (um T2 e dois T3) é assunto de intenso debate.

O processo de oxido-redução ocorre com a assistência de quatro átomos de cobre que formam o núcleo catalítico da enzima, conforme mostra a Figura 3 (RIVA, 2006).

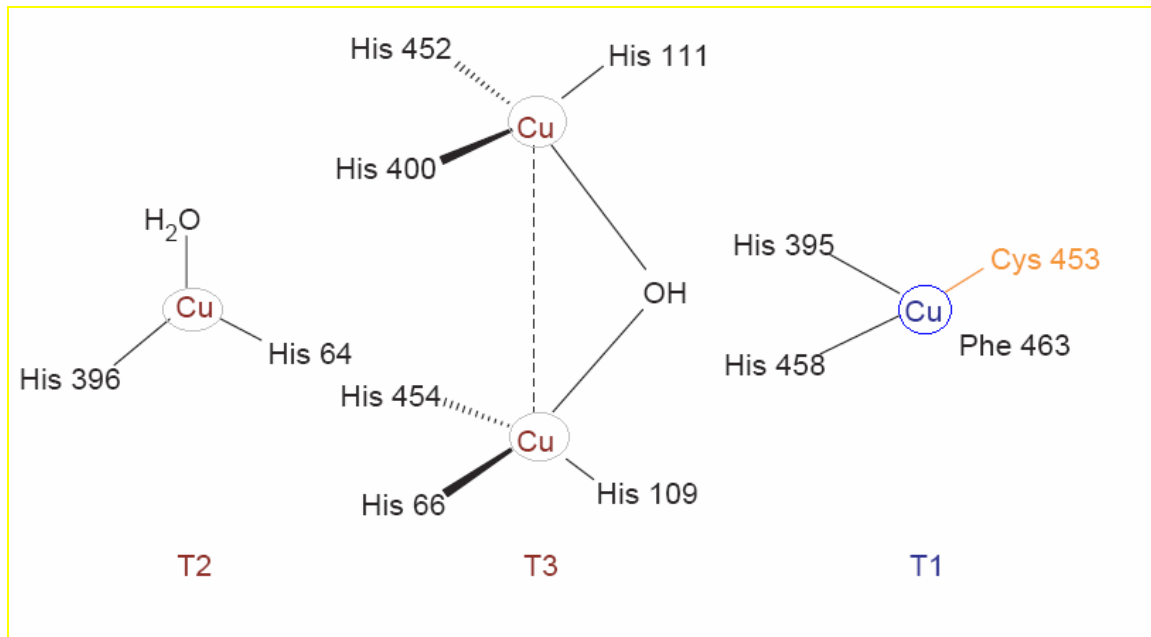


Figura 3 - Modelo do sítio catalítico da lacase de *Trametes versicolor* composto por quatro átomos de cobre. Tipo 1 (T1) o cobre confere uma típica coloração azul à proteína, onde ocorre a oxidação do substrato. Tipo 2 (T2) e 3 (T3) os átomos de cobre formam um conjunto onde ocorre a redução do oxigênio molecular a água .

As lacases também são caracterizadas pela sua baixa especificidade para substratos, de maneira que a eficiência de sua ação depende amplamente da natureza do substrato sobre o qual ela deverá agir. Difenóis simples, como hidroquinonas e catecóis, geralmente são bons substratos, mas a enzima também é capaz de oxidar polifenóis substituídos, aminas aromáticas, benzenotióis e uma série de outros compostos. Por muitos anos pensava-se que a lacase catalizava apenas substâncias fenólicas, mas estudos recentes demonstraram que esse número de substratos pôde ser ampliado por meio de mecanismos de reação envolvendo compostos denominados mediadores. (DURAN *et al*; ROSA; D'ANNIBALE; GIANFREDA, 2002).

Mediadores são moléculas de baixo peso molecular que estão indiretamente envolvidas na reação enzimática. No caso da lacase em particular, estes

são facilmente oxidados (no centro cobre T1) produzindo, em alguns casos, radicais catiônicos reativos e muito instáveis que podem oxidar substratos complexos antes de voltarem ao seu estado original. Neste mecanismo lacase-mediador, os mediadores oxidam substratos de alta massa molecular. Os elétrons recebidos pela lacase são finalmente transferidos reduzindo oxigênio para formação de água (nos sítios agrupados T2/T3) (BOURBONNAIS; PAICE, 1990; MAJCHERCZVK, 1999).

Em biossensores, o uso de mediadores veio incrementar a sensibilidade destes dispositivos, auxiliando a transferência de elétrons entre as enzimas oxidases, como a Lacase, e a superfície do eletrodo. Polímeros condutores também são utilizados com esta finalidade, porém a utilização de enzimas junto a outros agentes modificadores depende das técnicas empregadas para a imobilização.

1.3 TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO

Para um correto funcionamento do biossensor, o componente biológico deve estar convenientemente unido ao transdutor. Várias técnicas de imobilização dos biocomponentes, mais particularmente de enzimas, têm sido desenvolvidas: adsorção, ligação covalente, ligação cruzada e a oclusão com imobilização em filmes ou matrizes polimérica (os). No entanto alguns desses processos mais comuns, representados na Figura 4, em muitos casos, estão passivos a problemas, como a baixa reprodutibilidade na manufatura e pouca homogeneidade durante a deposição na superfície, fatos que muitas vezes limitam sua utilização em determinações analíticas. (FREIRE, DURAN; KUBOTA, 2001).

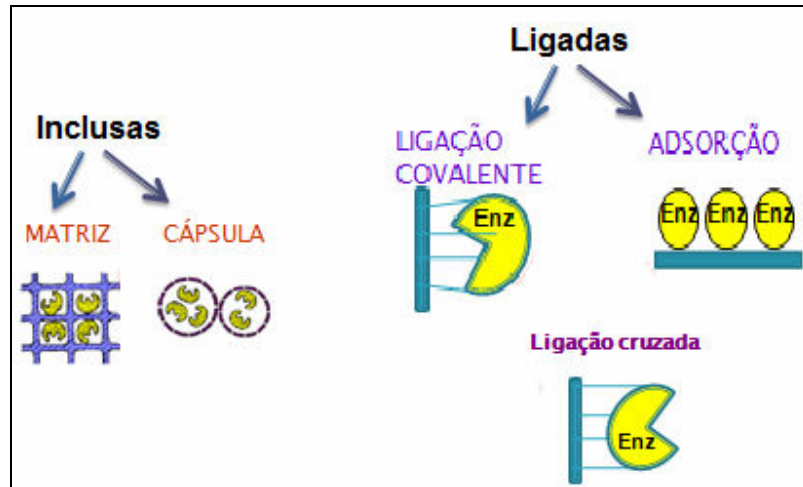


Figura 4 – Esquema dos principais métodos de imobilização do elemento biológico em biossensores.

1.3.1 Adsorção

Na adsorção, o material biológico é fixado fisicamente na superfície do sensor por meio de forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbicas, apresentando a vantagem de ser extremamente simples (AHUJA *et al.*, 2007; JUNFENG *et al.*, 2006).

A adsorção consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado e na exposição, em geral, da imersão do eletrodo a esta solução.

Este método proporciona incorporação simples e rápida da biomolécula, embora a união seja muito fraca, o que resulta na perda de material e redução de vida útil do sensor (SEGNINI, 2003).

1.3.2 Ligação Covalente

Alguns grupos funcionais da enzima, que não sejam essenciais para a atividade catalítica da enzima, podem unir-se a alguma matriz sólida mediante ligações covalentes (JUNFENG *et al.*, 2006).

É importante que os sítios ativos nas biomoléculas não sejam afetados pelo processo de imobilização, para que não se perca a sua atividade. Este método de ligação covalente proporciona uma maior estabilidade aos biossensores e é mais amplamente utilizado, por outro lado apresenta o inconveniente de que a modificação da enzima pode levar à diminuição ou a inativação de sua atividade catalítica (VIEIRA; FATIBELLO FILHO, 2003).

1.3.3 Ligação Covalente Cruzada

O procedimento de ligação covalente cruzada baseia-se na ligação cruzada entre os grupos amino do suporte com os grupos amino das biomoléculas, empregando-se reagente bi ou multifuncionais. O glutaraldeído é o agente de entrecruzamento mais utilizado devido ao fator de ser barato e solúvel em água (TELES; FONSECA, 2008; JUNFENG *et al.*, 2006; AHUJA *et al.*, 2007).

Porém, apesar de ser um método bastante simples, nem sempre é fácil controlar as condições experimentais e a integridade do elemento biológico pode não ser totalmente conservada (LOJOU; BIANCO, 2006).

2.3.4 Filmes ou Matrizes Poliméricos (As)

O uso de filmes poliméricos e membranas que acabam por cobrir a superfície do eletrodo e protegê-la de impurezas e interferentes, também é praticável na imobilização de agentes modificadores.

Ao contrário das técnicas vista anteriormente, a modificação com membranas poliméricas permite a imobilização em muitas monocamadas da espécie ativa na superfície modificada com filmes poliméricos aumentando a consideravelmente a resposta eletroquímica (PEREIRA, SANTOS; KUBOTA, 2002).

Os filmes poliméricos ainda oferecem vantagens como: bloquear interferentes, proteção da superfície do sensor contra impurezas e alta velocidade de transferência de elétrons. Como principal desvantagem do método podemos citar a dificuldade de se formar filmes homogêneos e reproduzíveis (AHUJA *et al.*, 2007; GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007).

O polipirrol e seus derivados estão entre os monômeros mais utilizados por sua versatilidade e a grande variedade de espécies, que apresentam propriedades redox, capazes de se ligar ao grupo pirrol (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007).

Entre as diversas técnicas de produção de filmes poliméricos destaca-se o processo conhecido como “*casting*”. Este consiste em gotejar sobre a superfície gotas da solução do polímero, a qual também está incluída a biomolécula, e deixar evaporar o solvente com o controle ou não de temperatura. Neste caso, após a evaporação do solvente, têm-se a biomolécula envolvida pelo filme formado (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002).

Outra técnica que vem se destacando na formação de filmes poliméricos para imobilização do biocomponente é a de automontagem (do inglês *Self-Assembly*), também conhecida como camada por camada – LbL (*Layer-by-Layer*). Esta técnica tem se mostrado extremamente promissora, capaz de produzir filmes ultrafinos organizados em nível nanométrico de diferentes tipos de materiais de interesse, de maneira simples e barata (CHEN, 2006; RODRIGUEZ *et al.*, 2009; DECHER, 1997).

Uma das vantagens oferecidas por este método refere-se ao solvente, comumente utilizado, água, embora esta característica também limite a gama de polímeros empregados (MATTOSO; PATERNO; OLIVEIRA JUNIOR, 2001).

CAPÍTULO 2

CONSTRUÇÃO DE ELETRODOS MODIFICADOS COM A ENZIMA LACASE (NOVOZYM 51003) IMOBILIZADA EM PASTA DE CARBONO

2.1 INTRODUÇÃO

Da necessidade de novos métodos analíticos, que sejam mais versáteis, rápidos, seletivos e sensíveis, ganham importância os biossensores que são instrumentos que apresentam estas características, além de relativo baixo custo de construção e estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento “*in site*” rápido, representando uma ferramenta promissora para complementar as técnicas existentes (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). Os biossensores são um subgrupo de sensores contendo eletrodos modificados com material biológico imobilizado e adsorvido à superfície de um transdutor (CLARKS; LYONS, 1962; FATIBELLO FILHO; CAPELATTO, 1992; MARQUES; YAMANAKA; 2008). Basicamente os eletrodos enzimáticos têm a sua superfície modificada por um material composto contendo a enzima adsorvida a um transdutor que irá transformar o sinal resultante da reação bioquímica de reconhecimento, enzima-substrato, em outra forma de sinal mensurável (VISWANATHAN; RADECKA; RADECKI, 2009).

A imobilização da enzima, purificada em um tecido vegetal ou em extrato bruto, é um fator importante para a confiabilidade do sensor uma vez que a resposta desta ao reconhecer o substrato depende da estabilidade do eletrodo. O principal problema durante o processo de imobilização de uma enzima pode ser a perda parcial ou total da atividade, que pode ser atribuída a diversos fatores, como propriedades da própria enzima, do suporte, dos reagentes utilizados e das condições experimentais (CHEN, 2006). Esta dificuldade pode ser diminuída pela imobilização adequada da molécula de proteína, o que diminui a velocidade de desnaturação da enzima (FREIRE; DURAN; KUBOTA, 2001; GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002).

No mecanismo de imobilização por adsorção, vários tipos de carbono são usados como eletrodos, dentre eles, pode-se citar o carbono vítreo, fibras de carbono, espuma de carbono e outras formas de grafite. O grafite em pó, em especial, pode ser utilizado na preparação de materiais compósitos, aglutinado por polímeros, óleos não condutores e parafinas (AHUJA *et al.*, 2007; JUNFENG *et al.*, 2006).

Enzimas são catalisadores biológicos usadas em reações com substrato específico freqüentemente empregadas como agentes modificadores de eletrodo, aglutinadas através da utilização de um óleo mineral misturado a um tipo de material carbonáceo.

Eletrodos de pasta de carbono (EPC) são apropriados para o desenvolvimento de biossensores, pois possuem baixa corrente de fundo mesmo em grandes variações de potencial quando comparado com outros eletrodos sólidos. A enzima imobilizada em pasta de carbono oferece vantagens tais como: facilidade de preparação, baixo custo e facilidade de manuseio do eletrodo (PEREIRA, SANTOS, KUBOTA; 2002).

O primeiro eletrodo de pasta de carbono modificado com enzima foi proposto na década de 60, mais precisamente em 1962, dois cientistas, Clark e Lyons, integraram a enzima Glicose oxidase a um eletrodo de pasta de carbono e o utilizaram na determinação de glicose em amostras de sangue (FATIBELLO FILHO; VIEIRA; LUPETTI; 2003).

Excelentes revisões sobre eletrodos de pasta de carbono modificados com presença de enzimas foram recentemente publicadas, como o trabalho de Rodrigues e Rivas que relataram as características e vantagens do eletrodo compósito preparado, usando-se partículas de vítreo aglutinadas com óleo mineral, como biossensor enzimático. O eletrodo foi modificado com a enzima Polifenol oxidase e usado para a quantificação de compostos fenólicos e catecóis, como hidroquinona e dopamina (apud OLIVEIRA, 2004). A descrição destes trabalhos tornaria esta sessão bastante extensa, entretanto, destaca-se o desenvolvimento de eletrodos de pasta de carbono modificados com enzima descritos no item 1.1.1 do capítulo 1.

Lacases (*p*-difenoil: oxigenioxioreductase; E.C.1.10.3.2) são enzimas que catalisam a oxidação de diferentes tipos de fenóis, aminas e ligninas acopladas no

oxigênio da molécula (ROSSATTO; 2001). Essas enzimas são produzidas por diversos organismos, mas ocorrem em maior quantidade em fungos lignolíticos (QUAN; SHIN, 2004).

Lacases são importantes enzimas para aplicações biotecnológicas, sendo utilizadas, como por exemplo, no setor industrial, em indústrias de papel e celulose (RAGHUKUMAR; D'SOUZA-TICLO; VERMA, 2008), atuando como bioclareadores, potencial substituta do cloro, que é ambientalmente nocivo devido à geração de compostos clorados altamente tóxicos, e no monitoramento ambiental sendo aplicadas em biossensores amperométricos utilizados para a determinação de compostos poli-fenólicos ou descoloração de água de efluentes industriais (indústrias de plástico, herbicidas, tintas etc.) (WIDSTEN; KANDELBAUER, 2007; COUTO; HERRERA, 2006).

Como componentes de biossensores, a lacase oxida compostos fenólicos em seus produtos correspondentes, as quinonas (DURAN; ROSA; D'ANNIBALE; GIANFREDA, 2002). Há uma redução eletroquímica de cada um desses produtos gerando uma corrente que é proporcional à espécie química oxidada, ou seja, proporcional à concentração de fenóis presentes na solução da amostra (DEKKER; BARBOSA, 2001).

Biossensores contendo o eletrodo enzimático à base de lacase tiveram resposta amperométrica estável, demonstrados por Yaropolov e colaboradores (1994), que aplicaram o instrumento no monitoramento de compostos fenólicos presentes em efluentes industriais. Estes biossensores permitiram uma análise com frequência de 40 amostras por hora sem nenhuma queda na atividade da lacase.

Biossensores amperométricos modificados com mediadores tem sido um dos principais campos de pesquisa com eletrodos enzimáticos (AHUJA *et al.*, 2007). Mediadores tais como: hexacianoferrato, ferroceno, azul de metileno, ABTS, entre outros, são compostos de baixo peso molecular que facilitam a troca de elétrons entre a enzima e o substrato, sendo primeiro oxidado pela enzima e depois reduzido pelo substrato. A incorporação destes compostos no eletrodo tem sido feita por adsorção, oclusão em filmes poliméricos ou adicionados em pasta de carbono. O mediador redox ideal deve ser um bom substrato para a lacase; as formas reduzida e oxidada devem

ser estáveis e não devem inibir a reação enzimática. A Figura 5, a seguir, mostra o esquema da conversão redox, cíclica, indicando o efeito de um mediador na atividade catalítica da enzima lacase (JOHANNES; MAJCHERCZYK, 2000).

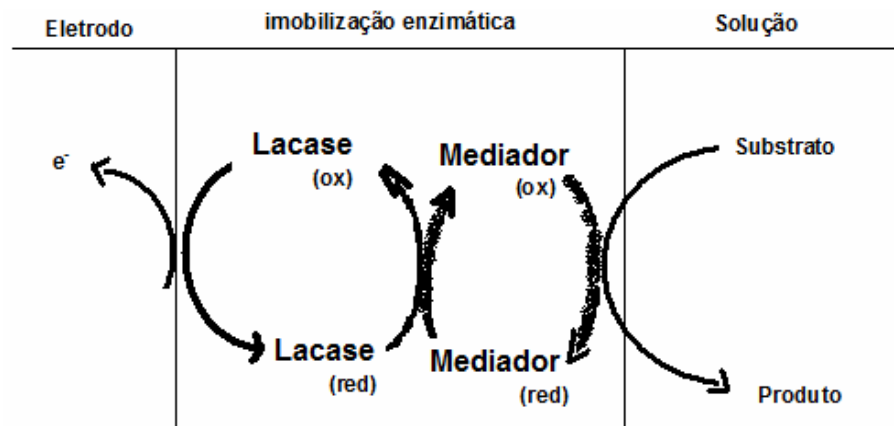


Figura 5 - Esquema indicando o efeito do mediador na catálise enzimática de uma lacase.

Considerado como o primeiro mediador referido para a lacase, o sal de ABTS (2,2- azino- bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (RAGHUKUMAR; D'SOUZA-TICLO; VERMA, 2008) tem sido aplicado juntamente com esta enzima numa mistura de pasta de carbono formada por grafite em pó e um óleo aglutinante na construção de eletrodos modificados, procedimento que vem resultando em melhores condições de estabilidade e sensibilidade para os biossensores. A reação do ABTS pela enzima desenvolve rapidamente radicais (corados), estáveis e que podem reagir com fenóis, de acordo com os seus potenciais redox, formando novos radicais, fenoxilo, que desencadeiam novas reações. Nessa interação os radicais formados regeneram ABTS.

A Figura 6 a seguir mostra um esquema da oxidação e redução do ABTS na presença da lacase (CALL; MUCKE, 1997).

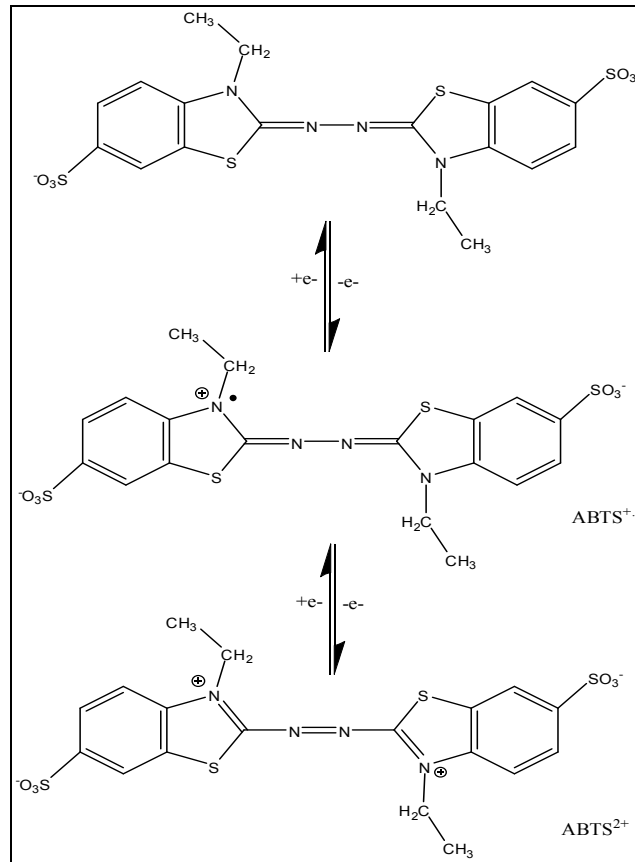


Figura 6 - Mecanismo representativo da oxidação do ABTS na presença de lacase.

Fonte: (Adaptado de MOROZOVA, et al. 2007b).

De acordo com o mecanismo representado, a oxidação do ABTS pela enzima lacase acontece em duas etapas sendo que em cada uma destas etapas, está envolvida a remoção de um elétron. Estudos recentes (FABRINI; GALLI; GENTILI, 2002), demonstraram através de voltametria cíclica que inicialmente há a formação do cátion radicalar $ABTS^{\bullet+}$, seguido por uma oxidação lenta do cátion radicalar ao dicátionio $ABTS^{2+}$.

Desde 1990, quando o ABTS foi encontrado como um mediador para substrato ou ativador da catálise enzimática (BOURBONNAIS, PAICE; 1990) o número de compostos que podem ser convertidos pela lacase aumentaram drasticamente, antes se pensava que estas enzimas catalisavam apenas a oxidação de compostos fenólicos, desde então o sal de ABTS, tem sido amplamente utilizado como mediador de reação catalítica envolvendo a lacase (CORTES, 2008).

No presente trabalho foram estudadas propriedades eletroquímicas de eletrodos de pasta de carbono envolvendo a lacase (NOVOZYM 51003[®]). A adição de um mediador foi estudada como forma de melhorar o mecanismo de troca de elétrons, na superfície do eletrodo, e de estender a ação desta enzima para uma variedade de substratos. Assim, espera-se que um aumento na resposta amperométrica do eletrodo. Outros parâmetros, tais como pH e concentração de lacase também foram estudados. A voltametria cíclica foi à técnica utilizada para caracterizar o eletrodo modificado com lacase imobilizada na pasta de carbono.

2.2 PARTE EXPERIMENTAL

2.2.1 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico (PA) e usado sem purificação prévia. A água usada na preparação das soluções foi deionizada e ultrapurificada (Mili-q, Milipore, resistência nominal, 18,2 mΩ).

2.2.1.1 Solução de cloreto de potássio

A solução de KCl 0,3 mol.L⁻¹ foi preparada adicionando-se 0,558 g do composto diluído em balão volumétrico para 25 mL.

2.2.1.2 Solução de ABTS (2,2' -azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

A solução de ABTS 2mmol L^{-1} foi preparada adicionando-se 0,055 g do composto diluído em balão volumétrico para 50 mL.

2.2.1.3 Solução de fenol

A solução de fenol $0,1\text{mol L}^{-1}$ foi preparada adicionando-se 0,235 g do composto diluído em balão volumétrico para 25 mL.

2.1.4 Obtenção da Enzima de extrato bruto do Fungo *Aspergillus Oryzae*

A lacase do fungo *Aspergillus oryzae* foi obtida a partir de uma amostra do produto NOVOZYM 51003[®], gentilmente cedida pela empresa Novozymes.

2.2.2 Determinação da Atividade Enzimática da Lacase

A atividade da lacase foi determinada através da oxidação do ABTS como substrato, contido em solução de 50mmol.L^{-1} , em pH 3,00 (tampão Mac'Illvaine, 120mmol L^{-1}) à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, como descrito por Barbosa e Dekker (1996). O tempo de reação foi de 5 minutos.

Para a determinação de atividade da enzima lacase decorrente da oxidação do ABTS, leituras foram realizadas em comprimento de onda 420 nm utilizando um espectrofotômetro (METROLAB 1700, UV-VIS).

A unidade de atividade da lacase foi definida como o número de μmol de ABTS oxidado por minuto por mL da solução de enzima lacase (Novozym 51003[®]).

2.2.3 Preparação dos Eletrodos de Pasta de Carbono

O eletrodo de trabalho (EPC/lacase) utilizado foi o de pasta de carbono modificado com a enzima de extrato bruto do *Aspergillus oryzae* (Novozym 51003[®]). A enzima foi adicionada e aglutinada na mistura de pasta de carbono preparada pela adição de pó de grafite (Fluka), e de óleo mineral comercial (Nujol da marca União Química). Dois eletrodos de pasta de carbono foram preparados, além do eletrodo de trabalho (EPC/lacase), um segundo eletrodo de pasta de carbono sem a presença da enzima (EPC), foi construído, quando o eletrodo de trabalho era construído, a mistura de pasta de carbono era preparada por pó de grafite, óleo mineral (Nujol) e lacase (Novozym 51003[®]) na seguinte proporção em massa: 75%, 23% e 2%, respectivamente. As pastas foram preparadas através da adição dos componentes a um almofariz e maceradas com auxílio de pistilo por um período de 40 minutos, quando a pasta adquire uma consistência adequada.

Preparadas às misturas, as pastas foram colocadas nas extremidades de seringas de plástico de 1 mL (seringas clínicas para insulina), modificadas com um fio de cobre acoplado ao embolo ligado, para o contato elétrico externo, a uma secção de grafite. O contato entre o fio de cobre e a secção de grafite foi melhorado pela aplicação de uma tinta condutiva (Condumax plus). A Figura 7 mostra o esquema do eletrodo construído:

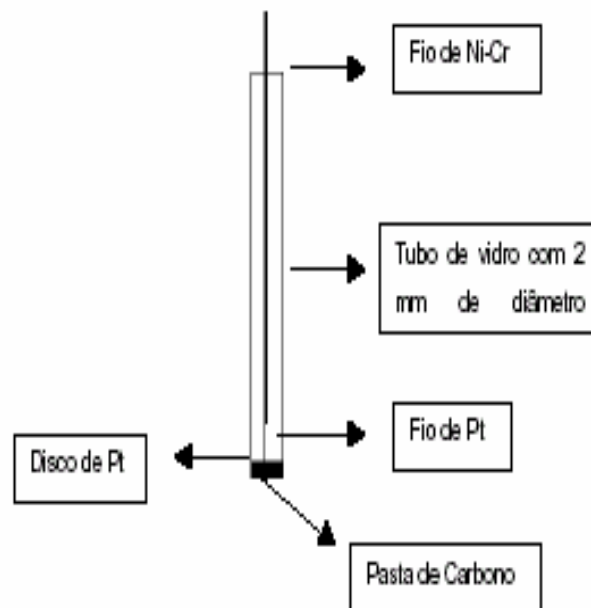


Figura 7 - Esquema do eletrodo de pasta de carbono modificado construído.

As pastas de carbono que eram preparadas assim como os eletrodos de pasta de carbono, ficavam sempre armazenados dentro de recipientes apropriados e mantidos em geladeira a uma temperatura próxima de 4°C.

Para estudo dos comportamentos voltamétricos dos eletrodos de pasta de carbono, foram preparadas as seguintes soluções eletrolíticas:

- KCl 0,3 mol L⁻¹
- ABTS 2,0 mmol L⁻¹
- KCl 0,3 mol L⁻¹ mais ABTS 2,0 mmol L⁻¹, pHs: 2, 3 e 4
- KCl 0,3 mol L⁻¹ mais Fenol 0,1 mol L⁻¹ pHs: 3, 4, 5, 6 e 7

O pH das soluções foi ajustado com soluções de HCl e KOH diluídos, utilizando-se um pHmetro para confirmação dos valores.

2.2.4 Medidas Voltamétricas (Caracterização Eletroquímica)

A voltametria cíclica é uma técnica usada para informações qualitativas e quantitativas de reações eletroquímicas, apresentando vantagens como: sensibilidade, portabilidade e versatilidade. As informações são obtidas por meio de medidas da corrente em função de um potencial aplicado usando eletrodos imersos em solução. A reação de redox acontece na interface entre a superfície do eletrodo e a solução o qual esta imersa.

Os experimentos voltamétricos, Figura 8, foram realizados em um potenciostato MQPG-01, em conjunto com a interface MQ/12/8PG conectado a um microcomputador para controle do potencial e aquisição de dados. Um eletrodo de Ag/AgCl (prata-cloreto de prata) serviu como referência e uma espiral de platina, como eletrodo auxiliar.

O contra eletrodo tem a função de fornecer a corrente requerida pelo eletrodo de trabalho sem influenciar nas características e nas determinações dos dados. O eletrodo de trabalho assume o potencial aplicado a ele enquanto o de referência mantém o potencial constante, durante a medida na célula eletroquímica. Assim, a corrente gerada passará entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo. O sinal então poderá ser amplificado e processado por um sistema registrador.

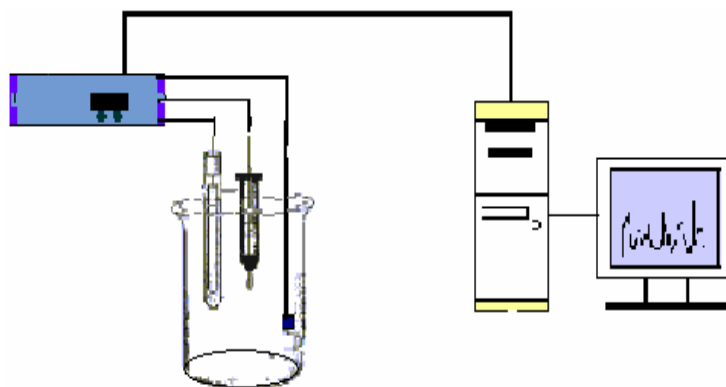


Figura 8 - Representação esquemática do sistema constituído por três eletrodos para realização de medidas de voltametria cíclica.

O eletrólito suporte, como por exemplo, o KCl, deve ser utilizado, para evitar a migração dos reagentes, e dos produtos em direção aos eletrodos, assim como também controlar a força iônica e melhorar o transporte de carga na solução.

2.2.4.1 Célula voltamétrica

Todas as medidas voltamétricas foram feitas em uma célula eletroquímica de vidro com capacidade para 25 mL, contendo o eletrodo composto de (trabalho), o eletrodo de referência Ag/AgCl e o contra eletrodo, ligados ao potenciostato. A Figura 9 mostra a fotografia da célula eletroquímica utilizada.

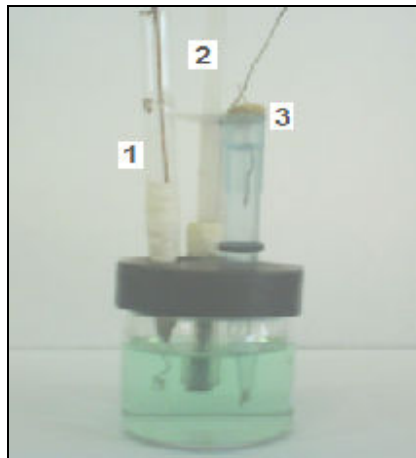


Figura 9 - Foto da célula eletroquímica utilizada nas determinações analíticas. Observa-se o eletrodo de referência Ag/AgCl (3), à esquerda se observa o contra eletrodo de platina (1) e ao centro o eletrodo de trabalho descrito (2).

Os voltamogramas cíclicos foram realizados sob as seguintes condições: velocidade de varredura igual a 20 mV s^{-1} e janela de potencial abrangendo de 0 à +1,0 V.

2.2.5 Efeito do Mediador

Para o estudo do efeito do mediador foram realizadas voltametrias cíclicas de eletrodos de pasta de carbono modificadas com a enzima lacase (Novozym 51003[®]) e ABTS (solução 50 mmol L⁻¹).

Este estudo envolveu a construção de três eletrodos de pasta de carbono distintos, para o primeiro eletrodo (EPC) preparou-se 500 mg de pasta de carbono contendo na mistura: grafite em pó (75% m/m) mais óleo aglutinante Nujol (25% m/m), o segundo eletrodo de pasta de carbono modificada (EPC/lacase) contendo a mesma quantidade de grafite em pó mais 23% óleo aglutinante e 2% de lacase do *Aspergillus oryzae* (Novozym 51003[®]), e um terceiro eletrodo contendo os componentes em quantias idênticas ao anterior, mas adicionado sobre a mistura 200 µL da solução de ABTS 50 mmol L⁻¹(EPC/lacase/ABTS).

É importante ressaltar que o composto ABTS é muito utilizado na determinação da atividade catalítica da lacase atuando como substrato da enzima, entretanto, neste trabalho ele foi adicionado na mistura de pasta de carbono modificada com o propósito de estudá-lo como mediador, para avaliar seu efeito na resposta voltamétrica do eletrodo.

Os eletrodos foram imersos em uma cela eletroquímica contendo, solução eletrolítica KCl 0,3 mol L⁻¹, solução de ABTS 2 mol L⁻¹ e solução de KCl 0,3 mol L⁻¹ mais ABTS 2mmol L⁻¹, sendo esta última solução, preparada em três valores de pH: 2, 3 e 4, ajustado com soluções de HCl e KOH.

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos sob as seguintes condições: velocidade de varredura igual a 20 mV. s⁻¹ e janela de potencial abrangendo de 0 à +1,0 V nos diferentes eletrólitos anteriormente descritos.

2.2.6 Estudos da Quantidade da Enzima

Após verificar o efeito do mediador, os eletrodos de trabalho tiveram a pasta de carbono modificada pela adição de 0,1% em massa do sal de ABTS.

A avaliação da influência da quantidade de enzima lacase do *Aspergillus oryzae* (NOVOZYM 51003®) no processo de imobilização foi verificada em função da resposta voltamétrica dos eletrodos. Para isso, foram registrados voltamogramas cíclicos dos eletrodos variando o potencial de 0,0 a -1,0 V a 20 mV s⁻¹, em uma célula eletroquímica com 10 mL de solução eletrolítica preparada com fenol (0,1 mol L⁻¹), utilizando-se KCl (0,3 mol L⁻¹) como eletrólito suporte. Os volumes de solução da lacase do produto NOVOZYM 51003® foram 50 µL, 100 µL, 150 µL e 200 µL, que correspondia a 47, 94, 141 e 187 U (unidade de atividade enzimática), respectivamente.

2.2.7 Estudo da Influência do pH

O pH exerce grande influencia sobre as reações enzimáticas. As enzimas apresentam pH ótimo onde a atividade e a velocidade das reações são máximas. A molécula de lacase é uma glicoproteína dimérica, ou tetramérica, que usualmente contém quatro átomos de cobre por monômero, ligados a três sítios de redox. Dependendo do valor de pH, a lacase, pode sofrer desnaturação, isto é, sua conformação nativa pode ser alterada perdendo parcial ou totalmente sua atividade catalítica.

Para o estudo da influência do pH, avaliou-se a resposta voltamétrica do eletrodo de trabalho em solução de KCl (0,3 mol L⁻¹) e Fenol (0,1 mol L⁻¹) nos seguintes valores de pH: 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0, ajustados com soluções de HCl e KOH diluídos. Simultaneamente, foi avaliada a quantidade de 50 µL de lacase (Produto Novozym 51003®) adicionada ao eletrodo de pasta de carbono.

O eletrodo teve seu comportamento voltamétrico avaliado utilizando-se solução de KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) e Fenol ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) com os cinco valores distintos de pH. Em seguida, o mesmo foi feito com o eletrodo de pasta de carbono modificado com adição de $100 \mu\text{L}$ da lacase e assim sucessivamente com $150 \mu\text{L}$ e $200 \mu\text{L}$ da enzima.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 AVALIAÇÃO da Atividade da Lacase (NOVOZYM 51003[®])

A atividade da lacase (NOVOZYM 51003[®]) foi de 937 U/mL . O valor é foi condizente com o previsto pelo fornecedor, ou seja, de 1000 U/mL .

2.3.2 Efeito da adição de Mediador nos eletrodos construídos de lacase de *Aspergillus Oryzae* (Novozym 51003[®])

A Figura 10 a seguir, apresenta o voltamograma do eletrodo de pasta de carbono (EPC) em solução de KCl ($0,3 \text{ mol.L}^{-1}$). Os resultados obtidos demonstram que não há evidências de picos de oxidação nem de redução, o que se conclui que a pasta de carbono não causa interferência na resposta dos eletrodos construídos.

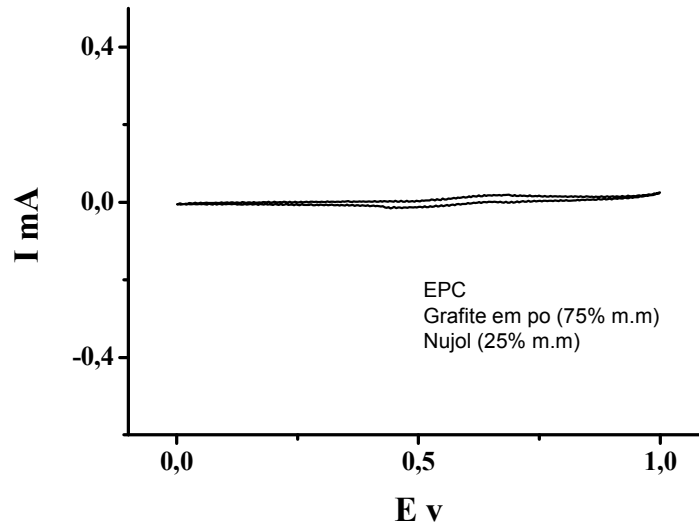


Figura 10 - Voltamograma cíclico do eletrodo de pasta de carbono (EPC) construído com grafite em pó (75% m/m) e nujol (25% m/m). Voltamograma obtido no eletrólito KCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado para 2,00. A velocidade de varredura foi de 20 mV s^{-1} .

Foi possível observar que para os eletrodos de pasta de carbono contendo lacase (Novozym 51003[®]), obteve-se um grande aumento de sua resposta amperométrica quando foi adicionado o ABTS como mediador.

A Figura 11 mostra um aumento pronunciado na sensibilidade do eletrodo de pasta de carbono quando incorporado em sua composição, solução de ABTS (50 mmol L^{-1}) como mediador. O eletrodo que não recebeu a adição do mediador apresentou um valor de E_{pc} de aproximadamente $+0,70 \text{ V}$ e um valor de I_{pc} de $41,5 \text{ } \mu\text{A}$. O eletrodo que possuía o mediador em sua pasta de carbono apresentou um valor de E_{pc} de $+0,73 \text{ V}$ e um valor de I_{pc} correspondente a $326,8 \text{ } \mu\text{A}$.

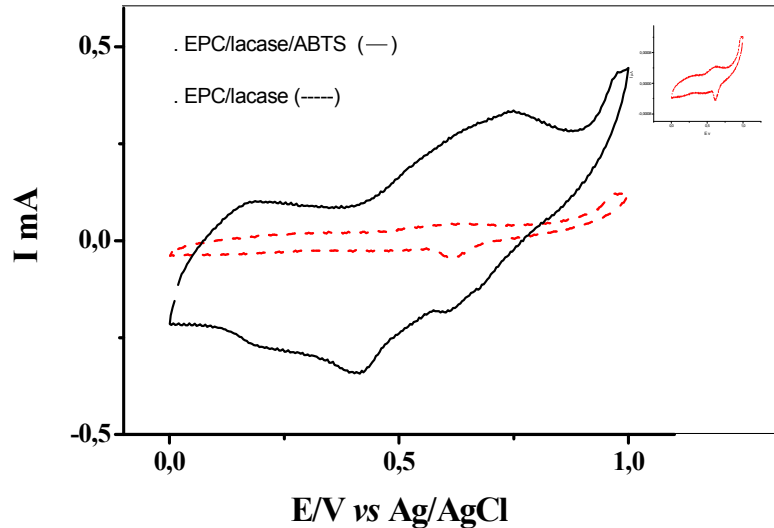


Figura 11 - Voltamogramas cíclicos sobrepostos de eletrodos construídos com mediador (—) e sem mediador (- - -). Os eletrodos foram caracterizados no eletrólito (ABTS 2 mmol.L⁻¹+ KCl 0,3 mol L⁻¹) com pH ajustado para 2,00. O agente biológico utilizado foi a enzima comercial do fungo *Aspergillus oryzae* (NOVOZYM 51003®). A velocidade de varredura foi de 20 mV s⁻¹.

Os perfis dos dois voltamogramas, neste caso, foram semelhantes. A adição do mediador ocasionou um aumento na resposta amperométrica em aproximadamente 8 vezes. A oxidação do ABTS pela lacase ocorre em duas etapas representadas pelos dois picos de oxidação obtidos do voltamograma do eletrodo EPC/lacase/ABTS. Inicialmente a oxidação do ABTS pela lacase ocorre com a formação do cátion radicalar ABTS^{•+} representado pelo primeiro pico de oxidação com um valor de $E_{p_{ocl}}$ de aproximadamente + 0,17 V, o segundo pico de oxidação, $E_{p_{ocl}}$, representa a oxidação do cátion radicalar formando o dicátion ABTS²⁺, com um valor de aproximadamente + 0,73 V.

A diferença nas correntes pode ser observada no voltamograma do eletrodo de pasta de carbono modificada não contendo a presença do mediador em sua composição, ilustrada em destaque na Figura 11.

O efeito da adição do mediador foi avaliado em outros dois valores de pH: 3,0 e 4,0 para a solução de , KCl (0,3 mol L⁻¹) mais ABTS (2,0 mmol L⁻¹). O pH foi

ajustado com soluções de hidróxido de potássio e ácido clorídrico diluídos. Os resultados descritos na Tabela 1 vem complementar a Figura 11. Novamente se observa um aumento acentuado nas respostas amperométricas com a adição do mediador, em todas as ocasiões.

Tabela 1 - Efeito da adição do mediador sobre a resposta amperométrica, para o I_{pc} , do sensor em diferentes valores de pH para o eletrólito (ABTS 2 mM+KCl 0,3 M). O agente biológico utilizado foi a lacase comercial de *Aspergillus oryzae*.

	Sem mediador	Com mediador	
pH	I_{pc} I (μ A)	I_{pc} II (μ A)	Razão I_{pc} I/ I_{pc} II
2,0	41,5	326,8	0,127
3,0	30,8	325,8	0,0945
4,0	39,6	366,0	0,108

O mecanismo de ação dos sistemas lacase-mediador têm sido estudados em virtude do seu potencial de aplicação (Johannes & Majcherczyk 2000). Os mediadores redox, descritos pela primeira vez por Bourbonnais e Paice (1990), permitem à lacase a oxidação de compostos não fenólicos, estendendo a amplitude de substratos em que a enzima catalisa reações de oxidação (Minussi *et al.* 2005, Posdnyakova *et al.* 2004, Gonzáles *et al.* 2002). Sistemas lacase-mediador tem sido muito utilizados em indústrias de papel e celulose, onde atuam na descoloração de corantes e, em indústrias têxteis, onde atuam no tratamento desses efluentes, removendo compostos xenobióticos aromáticos e poluentes (Call; Mucke, 1997). Shumakovich *et al.* (2006) estudaram as propriedades químicas e cinéticas de mediadores de lacase de *Trametes hirsuta* e ressaltam a eficiência destes na biodegradação de compostos xenobióticos pela lacase. Em relação aos sensores químicos, lacases e mediadores também tem sido muito utilizados como modificadores de superfície de eletrodos empregados na construção de biossensores. A literatura traz vários trabalhos sobre estes dispositivos de detecção com lacase aplicados para determinação de analitos de interesse farmacêutico, alimentício e principalmente

ambiental. Liu e Dong (2008) imobilizaram a lacase na superfície de nanotubos de carbono vítreo e observaram que a enzima manteve ótima atividade eletrocatalítica para a redução de oxigênio utilizando o ABTS como mediador. O biossensor pode ser usado para determinação de catecol com ampla faixa linear. Odaci *et al.* (2006) puderam verificar os efeitos de três diferentes mediadores, ou seja, HBT (1-hydroxybenzotriazole), VLA [ácido violúrico (5-ácido isonitrosobarbitúrico)] e TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-óxido radical) na resposta de um eletrodo com a enzima lacase imobilizada através de ligações covalentes com glutaraldeído. O eletrodo foi utilizado para determinação de paracetamol. A medida foi baseada na detecção do consumo de oxigênio em relação à oxidação do analito. Os autores observaram efeito notável sobre o sinal amperométrico com a presença dos mediadores e a lacase, proporcionando maior consumo de oxigênio durante a reação enzimática, com destaque para o HBT como mediador. Liu *et al.* (2005) verificaram para seu eletrodo de nanotubo de carbono com a enzima lacase imobilizada em matriz de quitosana o efeito do ABTS em favor da acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima. Fabrini *et al.* (2002); verificaram através de voltametria cíclica o papel de 12 mediadores na atividade da lacase e pôde observar no caso do ABTS, reações de oxidação imediatas deste composto melhorando o mecanismo de transferência de elétrons na superfície do eletrodo.

Posteriormente, os eletrodos foram construídos com a mesma configuração, porém acrescentando ABTS (0,1% m/m) à mistura de pasta de carbono modificada, visto que atuou como um bom mediador para a lacase, conforme mostram os voltamogramas da Figura 11. Portanto, optou-se por estudar a resposta voltamétrica do eletrodo em relação à quantidade de enzima e do pH do eletrólito.

2.3.3 Efeito da adição de concentrações de lacase e de diferentes valores de pH na resposta do eletrodo de pasta de carbono.

O efeito da concentração da lacase foi estudado utilizando-se volumes de 50 μL , 100 μL , 150 μL e 200 μL do produto NOVOZYM 51003[®] cujas atividades

enzimáticas correspondiam à 47, 94, 141 e 187 U, respectivamente, adicionadas à mistura de pasta de carbono.

Simultaneamente, foi avaliados os efeitos dos valores de pH: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0, da solução KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) mais fenol ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) sobre a melhor resposta do eletrodo

Os voltamogramas obtidos estão apresentados nas Figuras 12 a 15.

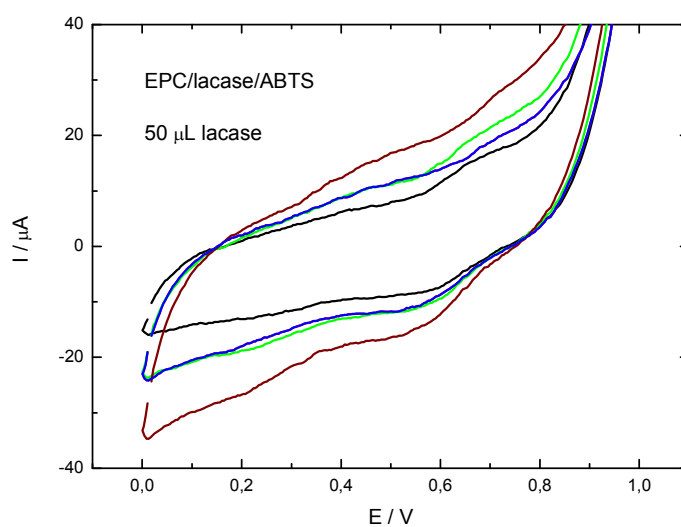


Figura 12 - Voltamogramas cíclicos para eletrodos de pasta de carbono com lacase de *Aspergillus oryzae* (Novozym 51003[®]) imobilizada (50 μL), em solução de fenol 0,1 M e KCl 0,3 M, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, em diferentes valores de pH: (—) 3,0; (—) 4,0; (—) 5,0; (—) 6,0; e, (—) 7,0.

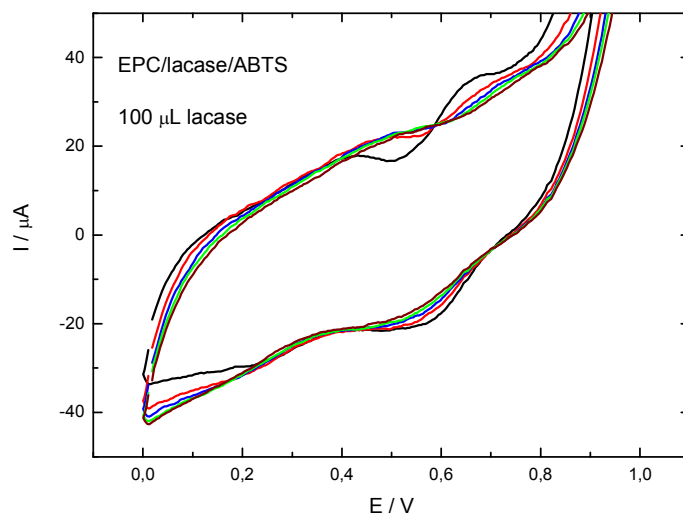


Figura 13 - Voltamogramas cíclicos para eletrodos de pasta de carbono com lacase de *Aspergillus oryzae* (Novozym 51003[®]) imobilizada (100 μL), em solução de fenol 0,1 M e KCl 0,3 M, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, em diferentes valores de pH: (—) 3,0; (—) 4,0; (—) 5,0; (—) 6,0; e, (—) 7,0.

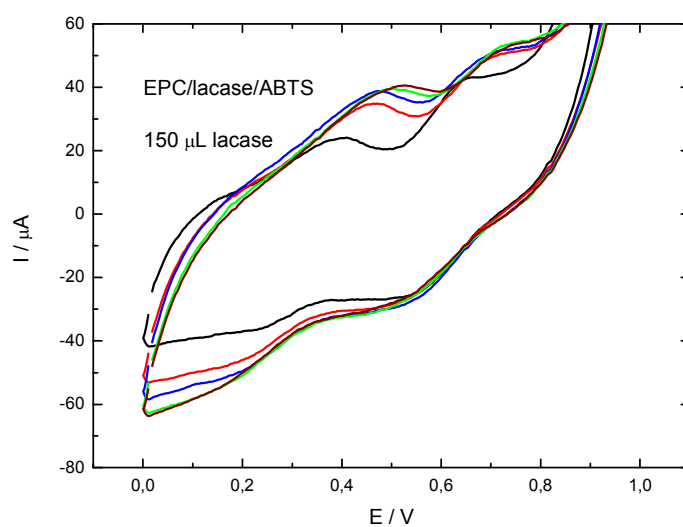


Figura 14: Voltamogramas cíclicos para eletrodos de pasta de carbono com lacase de *Aspergillus oryzae* (Novozym 51003[®]) imobilizada (150 μL), em solução de fenol 0,1 M e KCl 0,3 M, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, em diferentes valores de pH: (—) 3,0; (—) 4,0; (—) 5,0; (—) 6,0; e, (—) 7,0.

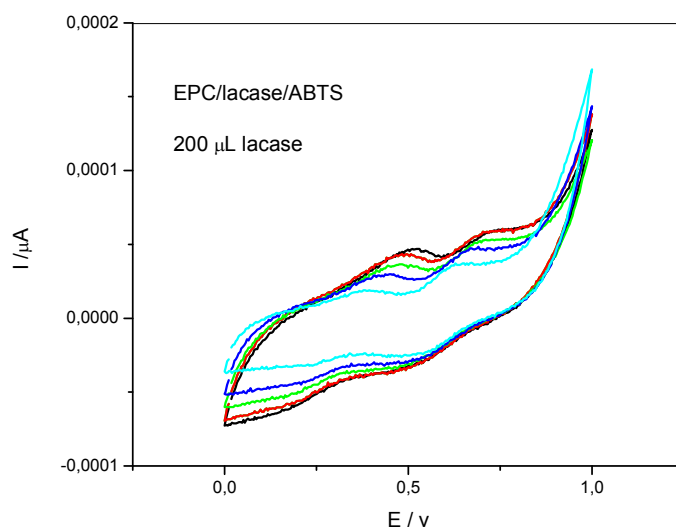


Figura 15 - Voltamogramas cíclicos para eletrodos de pasta de carbono com lacase de *Aspergillus oryzae* (Novozym 51003[®]) imobilizada (200 μL), em solução de fenol 0,1 M e KCl 0,3 M, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, em diferentes valores de pH: (—) 3,0; (—) 4,0; (—) 5,0; (—) 6,0; e, (—) 7,0.

A Figura 16 mostra uma comparação dos valores de corrente (em μA) quando foi fixado o potencial em 0,5 V em função do pH para concentrações de lacase (937 U mL^{-1}) de 50 μL , 100 μL , 150 μL e 200 μL .

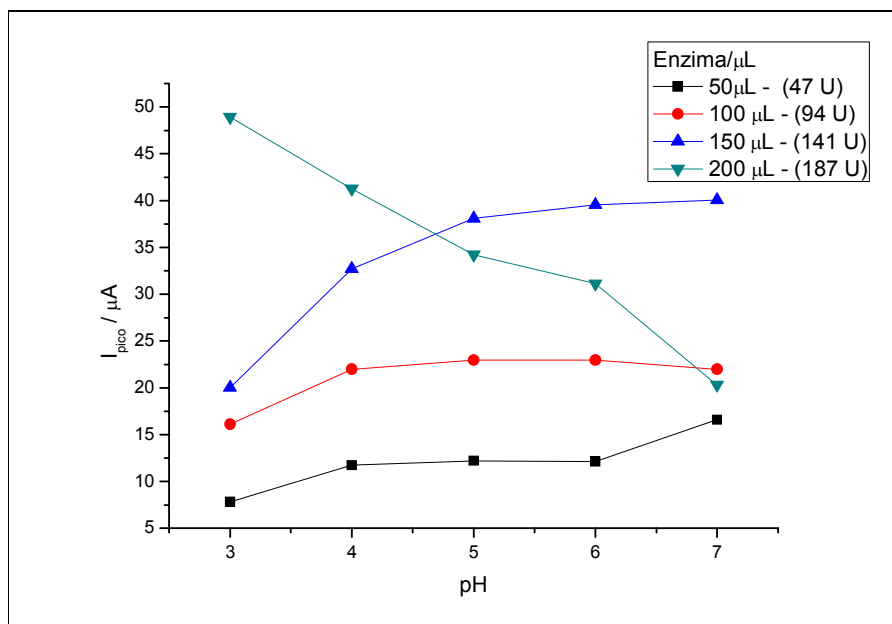


Figura 16 - Valores da corrente em (μA) quando o potencial foi fixado em 0,5 V (Voltamogramas cíclicos) para eletrodo de pasta de carbono com diferentes concentrações de lacase imobilizada em diferentes valores de pH'.

O efeito da concentração da lacase imobilizada mostrou uma maior sensibilidade quando foram adicionados à mistura da pasta de carbono 150 μL de solução da enzima. A tabela 2 mostra os resultados apresentados na Figura 16.

Tabela 2 - Resultados obtidos, nos estudos das variáveis: quantidades de enzima e de pH do eletrólito. O agente biológico utilizado foi a enzima lacase do fungo *Aspergillus oryzae* (Novozym 51003[®]).

Enzima / μL	pH	$I_E = 0,5\text{v}/\text{mA}$
50	3,0	7,81
50	4,0	11,72
50	5,0	12,21
50	6,0	12,12
50	7,0	16,60
100	3,0	16,12
100	4,0	21,98
100	5,0	22,96
100	6,0	22,96
100	7,0	21,98
150	3,0	20,03
150	4,0	32,73
150	5,0	38,10
150	6,0	39,57
150	7,0	40,06
200	3,0	48,93
200	4,0	41,28
200	5,0	34,24
200	6,0	31,13
200	7,0	20,30

Na avaliação de diferentes valores de pH para o sistema eletroquímico, utilizando-se o eletrodo de pasta de carbono com a lacase imobilizada, observou-se que houve um aumento da resposta do eletrodo com o aumento do pH da solução eletrolítica, quando foi adicionado à mistura de pasta de 150 μL de lacase de *Aspergillus oryzae* (Novozym 51003[®]).

Ainda da tabela 2 observa-se que ocorre um aumento da resposta do eletrodo de acordo com os valores de corrente medidas em função do pH: 3,0, 4,0 e 5,0

da solução quando foram adicionados à mistura de pasta de carbono as quantidades 50 μL e 100 μL de lacase (Novozym 51003[®]), sendo que para o volume de 100 μL , os valores de corrente praticamente mantiveram nos valores de pH 5,0 a pH 7,0.

Normalmente, o pH ótimo de atividade da lacase depende do tipo de substrato. No caso de fenóis, as lacases fungicas costumam ter atividade ótima no intervalo de pH entre 3,0 e 7,0 (Schneider *et al.*, 1999). Para o desenvolvimento de eletrodos de pasta de carbono modificadas com lacase é importante evitar a perda parcial ou total de atividade da enzima que pode ser atribuída por diversos fatores entre eles, o pH. Para Gomes e Rebelo (2003) que construíram um biossensor com a enzima lacase de *Coriolus versicolor* imobilizada em membranas e o aplicaram para determinação de vários compostos fenólicos em vinhos, como por exemplo, o catecol, a máxima resposta catalítica do sistema foi observada nos pH entre 4,5 e 5,5. O eletrodo de Freire, Durán e Kubota (2001), constituído de fibras de carbono e lacase de *Trametes versicolor* imobilizada covalentemente com carbodiimida e glutaraldeído, foi aplicado para determinação de compostos fenólicos. A dependência da resposta do biossensor em função do pH para uma solução de catecol 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foi avaliada aplicando-se um potencial de -100 mV. O biossensor apresentou máxima resposta amperometrica para pH 5,0 da solução de catecol demonstrando uma queda de sensibilidade no intervalo de pH entre 5,0 e 7,5. O biossensor de Leite, Fatibello-Filho e Barbosa (2003) que tinha a enzima lacase do fungo *Pleurotus ostreatus* imobilizada em pasta de carbono, foi empregado para determinação de adrenalina e dopamina em formulações farmacêuticas. O efeito do pH sobre a resposta do biossensor foi estudado no intervalo de 3,0 a 8,0 e os autores observaram aumento dos valores de corrente com o aumento dos valores de pH entre 3,0 a 7,0. O efeito da concentração de lacase também foi estudado no trabalho variando-se as concentrações entre 0,29 e 1,8 U/mg de enzima adicionadas á pasta de carbono. Foi observado um aumento da resposta do biossensor com aumento da concentração de lacase sendo que 1,2 U/mg da enzima foi o valor onde o biossensor apresentou sua melhor resposta.

2.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

A solução de lacase de *Aspergillus oryzae* teve sua atividade enzimática determinada e equivalente a 937 U/mL.

A adição do ABTS à pasta de carbono nos eletrodos como mediador para a ação da lacase se mostrou extremamente efetiva, proporcionando um aumento de aproximadamente 8 vezes na resposta amperométrica. Os valores de corrente (I_{pc}) tiveram aumento de 787% a 924%, e o pH 4,0 do eletrólito, proporcionou melhor resposta voltamétrica.

O estudo do efeito da concentração de lacase imobilizada sobre a resposta do eletrodo demonstrou que a resposta do eletrodo aumenta com o aumento da quantidade de enzima imobilizada até 150 μ L, tendo decrescido para 200 μ L.

A influência do pH na resposta do eletrodo de pasta de carbono, modificada com 150 μ L lacase (Novozym 51003) imobilizada, teve melhor desempenho quando o pH do eletrólito foi próximo da neutralidade.

O desenvolvimento de um biossensor estável com alto grau de seletividade, mantendo suas características de fácil manipulação e de portabilidade continua a ser um desafio para a área eletroanalítica.

Propõem-se para a continuidade do trabalho estudar outros métodos de imobilização do biocomponente, principal responsável pela seletividade do biossensor, objetivando maior estabilidade e sensibilidade para o mesmo, com utilização de polímero condutor e de filmes poliméricos que devem proteger a superfície do eletrodo contra impurezas, bloquear interferentes e favorecer a atividade catalítica.

CAPÍTULO 3

ELETRODOS MODIFICADOS UTILIZANDO POLIMERO CONDUTOR PARA IMOBILIZAÇÃO DE AGENTES BIOLÓGICOS

3.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo, um estudo sobre eletrodos quimicamente modificados com filmes poliméricos, será abordado. Neste contexto foram escolhidos componentes capazes de promover ou melhorar a estabilidade do eletrodo.

O polipirrol foi escolhido como agente modificador em função do seu caráter condutor e sua biocompatibilidade. O exopolissacarídeo botriosferana (EPS) foi escolhido por ser solúvel em água e melhorar a estabilidade da enzima imobilizada.

A adsorção de biomoléculas é o método mais simples de preparação dos eletrodos. Várias substâncias podem adsorber enzimas sobre suas superfícies, tais como alumina, carvão, celulose, sílica gel, vidro, etc. A união é muito fraca, o que resulta na perda de material e tempos de vida muito curtos (SEGNINI, 2003).

A imobilização do biocomponente através de filmes ou matrizes poliméricos (as) permite a imobilização de muitas monocamadas da espécie ativa na superfície modificada, ampliando consideravelmente a resposta eletroquímica (DONG, 2002). Os filmes poliméricos ainda oferecem a vantagem de proteger a superfície do sensor contra impurezas, bloquear interferentes e permitir alta velocidade de transferência de elétrons (KUBOTA, 2002).

Polímeros intrinsecamente condutores (PIC) ou polímeros eletroativos conjugados apresentam como vantagens: baixo custo, propriedades biológicas inertes, alta velocidade de transferências de elétrons e facilidade de síntese sobre qualquer superfície metálica, o que justificam a sua aplicação no desenvolvimento de novos sensores (LOFRANO, 2001; VISWANATHAN; RADECKA; RADECKII, 2009).

Os estudos com polímeros condutores tiveram seu início na década de 70, a descoberta do poliacetileno dopado é considerada o marco inicial dos polímeros

intrinsecamente condutores. Mas, foi em 1987 que aconteceu a primeira aplicação de polímeros condutores na imobilização de enzimas, a enzima era a Glicose oxidase e foi depositada em polipirrol sobre eletrodos de platina (ANDRADE, 2006; RAZOLA *et al.*, 2002).

Entre os polímeros condutores tais como: poli (anilina), poli (indol), e poli (pirrol), este último tem se destacado bastante na modificação de superfícies de eletrodos por apresentar características como: ser solúvel em água, podendo ser misturados juntamente com as enzimas, sem provocar a desnaturação destas, além formar do filme em uma única etapa, Figura 17 (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002).

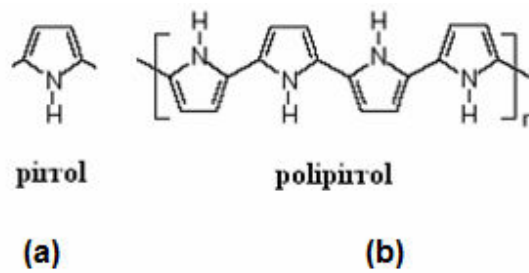


Figura 17 - Representação estrutural do pirrol (a) e do polipirrol (b).

O polímero de poli (pirrol) é formado sobre a superfície do eletrodo onde a enzima é depositada, assim a conexão enzima-eletrodo acontece sem envolver os sítios ativos da mesma, aumentando a sensibilidade do biossensor.

Vários eletrodos enzimáticos a base de polipirrol tem sido construídos, a imobilização da enzima na matriz polimérica pode ocorrer por interação física ou química e tem a finalidade de manter a proximidade da mesma com o eletrodo (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007).

A formação dos filmes poliméricos pode acontecer através de três procedimentos: “*casting*”, eletroporimerização e “*screen printing*” (COSNIER, 1999). A elaboração do filme polimérico através da técnica “*casting*” foi escolhida, visto que esse foi o procedimento utilizado por ser de baixo custo e de fácil obtenção.

No procedimento de “*casting*”, a formação do filme acontece quando ocorre a evaporação do solvente da solução contendo o polímero, adicionada ou

depositada na superfície do eletrodo (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002; TELES; FONSECA, 2008). A biomolécula também faz parte da solução e, portanto é incluída dentro do polímero formado. A desvantagem deste método é a dificuldade de se formar filmes homogêneos e reprodutíveis (TELES; FONSECA, 2008).

O volume de lacase de *Aspergillus oryzae* (Novozym 51003[®]) foi de 200 µL (187 U) para os eletrodos construídos, estes foram avaliados por voltametria cíclica utilizando como substratos: soluções de fenol, hidroquinona e benzoquinona. Uma solução de cloreto de potássio foi utilizada como eletrólito suporte.

As lacases são enzimas que catalisam a oxidação de várias substâncias aromáticas e inorgânicas. Hidroquinona, também chamada benzeno-1,4-diol, 1-4 dihidroxibenzeno ou ainda quinol, é um composto orgânico aromático o qual é um tipo de fenol, tendo a fórmula química $C_6H_4(OH)_2$ (LEITE; FATIBELLO FILHO; BARBOSA, 2003). A oxidação da hidroquinona catalisada pela enzima lacase produz como produto a parabenzoquinona, um dos isômeros de posição da benzoquinona, de fórmula química $C_6H_4O_2$, portanto a parabenzoquinona correspondente à forma oxidada da hidroquinona (WIDSTEN; KANDELBAUER, 2007).

A aplicação de um potencial no meio onde ocorre a reação de catalise pode regenerar a lacase novamente ao seu estado oxidado, e assim continuar atuando na atividade de reconhecimento.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 Reagentes e Soluções

Para o preparo das soluções foi utilizado os seguintes reagentes:

- **Monômero pirrol 99% (p.a)** – Este foi utilizado previamente destilado e estocado a temperatura de 4 °C.
- **Ferricianeto de Potássio (p.a)**
- **Cloreto de ferro (p.a)**
- **Benzoquinona 99% (p.a)**
- **Hidroquinona 99% (p.a)**
- **Iacase (NOVOZYM 51003[®])**, produzida pela empresa Novozymes, Curitiba-PR.
- **Exopolissacarídeo (EPS) Botriosferana**

3.2.1.1 Produção de exopolissacarídeo (EPS)

O Botriosferana foi produzido no Laboratório de Pesquisa de Bioquímica de Microrganismo do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e gentilmente cedidos pela Professora Dra. Aneli de Melo Barbosa.

3.2.1.2 Preparo das soluções

Pesou-se 1,056 g de $K_3Fe(CN)_6$, 0,34 g de $FeCl_3 \cdot H_2O$ e 0,025 g do exopolissacarídeo (EPS) Botriosferana que foram dissolvidos em 25 mL de água para preparar uma solução $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, $0,05 \text{ mol. L}^{-1}$ e 1 g/L , respectivamente.

A solução serviu para preparo de outras duas soluções, na primeira 10 mL desta foi adicionada 0,0335 g de pirrol ($0,05 \text{ mol. L}^{-1}$) mais 200 μL da enzima lacase de *Aspergillus oryzae* (Novozym 51003[®]). Na segunda, adicionou-se somente igual quantidade de pirrol. Os reagentes utilizados foram procedentes da Merck. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e ultrapurificada (Mili-q, Milipore, resistência nominal, 18, $2 \text{ m}\Omega$).

As duas soluções foram então filtradas lavando-se o papel de filtro com água, o polipirrol foi sintetizado quimicamente por exposição do monômero aos oxidantes, no caso dos sais de ferro, sendo que um pó preto também foi formado como resultado da síntese do polímero.

3.2.1.3 Construção dos eletrodos de pasta de carbono

As soluções obtidas da filtração citada anteriormente foram utilizadas na construção de dois eletrodos de pasta de carbono, utilizando-se seringas de plástico de 1 mL (seringas clínicas para insulina), modificadas com um fio de cobre acoplado ao embolo ligado, para o contato elétrico externo, a uma secção de grafite. A mistura de pasta de carbono foi preparada com 75% (m/m) de grafite em pó, 25% (m/m) de nujol e mais 100 μL da solução inicial obtida da filtração contendo a enzima. Esta mistura foi levada a um almofariz e maceradas com o auxílio de pistillo por um período de 40 minutos, quando a pasta adquiriu consistência adequada. Foram montados dois eletrodos de pasta de carbono: o primeiro foi modificada com polipirrol e lacase, EPC/Ppy/lacase; o segundo eletrodo, foi modificado somente com o polipirrol, EPC/Ppy,

assim este difere do anterior por conter na mistura carbonácea a solução obtida da filtração sem a lacase.

Os eletrodos foram analisados utilizando-se a voltametria cíclica, em soluções de KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) mais ABTS (2 mM) e em KCL ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) mais Fenol (2 mmol L^{-1}). A influencia da concentração de fenol foi estudada, variando-se as concentrações de fenol (0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 70,0; 100,0 mmol.L^{-1}).

Utilizando-se a mesma técnica da voltametria cíclica, os eletrodos foram mais uma vez estudados em solução de KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) e Hidroquinona (2 mmol L^{-1}), KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) e Benzoquinona (2 mmol L^{-1}), sendo que para estas soluções foi verificado também o melhor valor de pH (2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0) para a resposta do eletrodo e, posteriormente, então com este valor definido estudou-se a velocidade de varredura.

A solução de hidroquinona (2 mmol.L^{-1}) foi preparada adicionando-se 0,0110 g do composto diluída em balão volumétrico para 50 mL e a solução de benzoquinona (2 mmol L^{-1}) foi preparada adicionando-se 0,0108 g do composto diluída em balão volumétrico de 50 mL. Ambas as soluções foram preparadas diariamente, e para o ajuste do pH foram utilizados soluções de HCl e KOH.

3.2.2 Estudo da Velocidade de Varredura

Para este estudo foram realizadas voltametrias cíclicas em diferentes velocidade de varreduras de potenciais (2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1000 mV.s^{-1}), com eletrodo EPC/Ppy/lacase [compósito: 75% (p/p) de pó de grafite, 25% (p/p) de nujol e 100 μL de solução de lacase] imerso em soluções de hidroquinona (2 mmol.L^{-1}) e benzoquinona (2 mmol L^{-1}), ambas em KCl ($0,3 \text{ mol.L}^{-1}$) como eletrólito suporte e com pH 5,0.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Efeito da Presença do Modificador nos Eletrodos Utilizando como Substratos Soluções de ABTS e Fenol

Os eletrodos EPC/Ppy/lacase e EPC/Ppy foram analisados utilizando-se a voltametria cíclica, em soluções de KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) com ABTS (2 mmol.L^{-1}) e em KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) com Fenol 2 mmol L^{-1} .

A Figura 18 a seguir mostra o comportamento dos eletrodos apenas na presença do eletrólito suporte (KCl $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$). Observou-se o efeito da presença da lacase imobilizada no eletrodo EPC/Ppy/lacase quando foi feita a comparação dos voltamogramas. O eletrodo EPC/Ppy não apresentou picos de oxidação nem de redução, e o eletrodo EPC/Ppy/lacase apresentou pelo menos um pico de oxidação e um pico de redução.

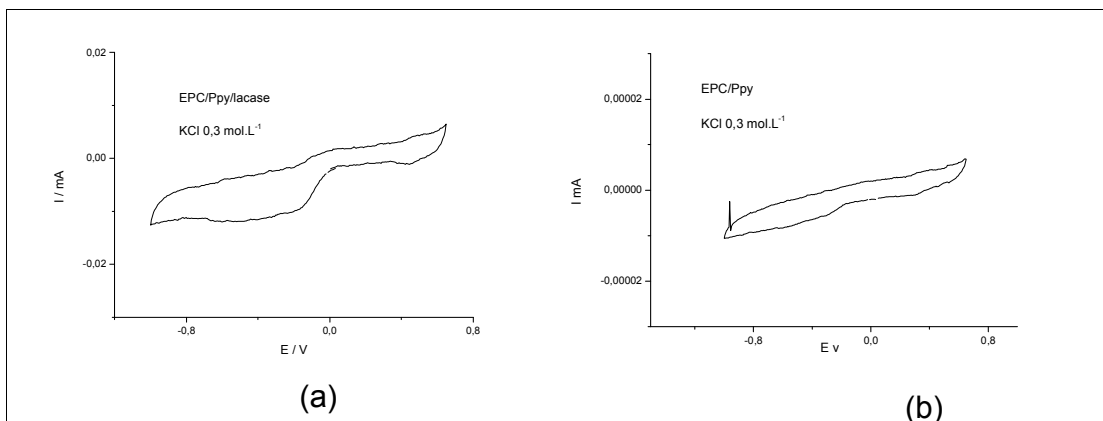


Figura 18 - Voltamogramas cíclicos para eletrodos EPC/Ppy/lacase (a) e EPC/Ppy (b) obtidos na presença de apenas KCl ($0,3 \text{ mol.L}^{-1}$) como eletrólito suporte com velocidade de varredura de $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

As Figuras 19 e 20 mostram a resposta amperométrica para os dois eletrodos, sendo que o eletrodo EPC/Ppy/lacase possui nos 100 μL da solução a presença da lacase (Novozym 51003[®]) em sua composição. Este eletrodo apresentou valores mais acentuados para as correntes relativas aos processos de redução e oxidação quando comparados com ABTS e fenol.

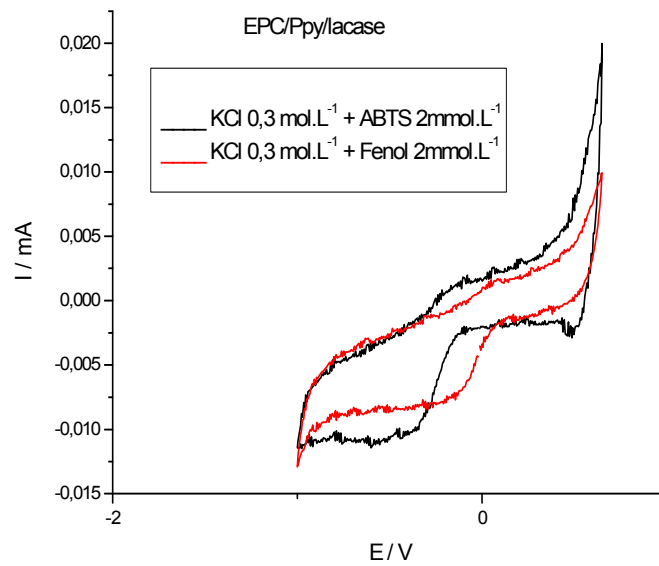


Figura 19 - Voltamogramas cíclicos para eletrodo EPC/Ppy/lacase obtido na presença de $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ABTS e $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ fenol com velocidade de varredura de $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ e eletrólito suporte KCl ($0,3 \text{ mol.L}^{-1}$).

O eletrodo que não possuía a lacase na sua composição, ou seja, o eletrodo EPC/Ppy, Figura 20, apresentou valores de E_{pc} próximos ao anterior, porem com diferença mais significativa para valores de I_{pc} .

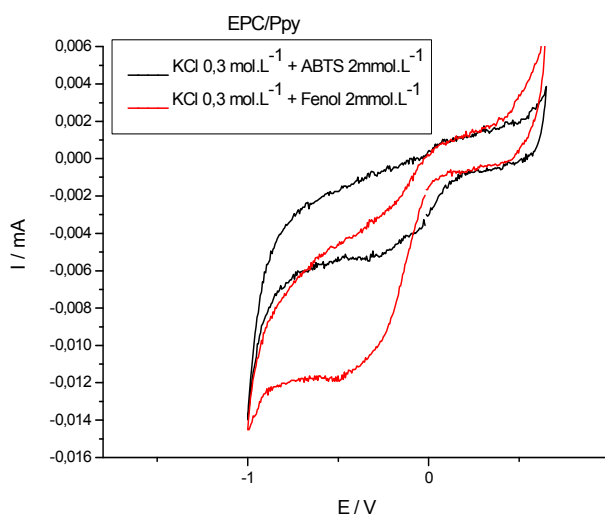


Figura 20 - Voltamogramas cíclicos para eletrodo EPC/Ppy, obtido na presença de $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ABTS e $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ fenol com velocidade de varredura de $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ e eletrólito suporte KCl ($0,3 \text{ mol.L}^{-1}$).

Devido a semelhança dos voltamogramas, foi difícil realizar uma análise quantitativa em termos de valores de E_{pc} e I_{pc} . A tabela a seguir traz os valores, quando foi possível medi-los para os eletrodos EPC/Ppy e EPC/Ppy/lacase nas soluções de ABTS, fenol e de KCl (eletrólito suporte).

Tabela 3: Valores de potenciais de pico ($E_{P,ox}$, oxidação) e de corrente de pico ($j_{P,ox}$, oxidação) para os voltamogramas dos eletrodos, EPC/Ppy e EPC/Ppy/lacase, utilizando-se as soluções de ABTS, fenol e de KCl (eletrólito suporte).

Eletrodo	KCl (branco)		ABTS		Fenol	
	E_{pc} (V)	$I_{pc,ox}$ (μA)	E_{pc} (V)	$I_{pc,ox}$ (μA)	E_{pc} (V)	$I_{PC,ox}$ (μA)
EPC/Ppy	n.d.	n.d.	0,07	$0,7 \cdot 10^{-3}$	0,07	$0,7 \cdot 10^{-3}$
EPC/Ppy/lacase	0,02	$2 \cdot 10^{-3}$	0,05	$2 \cdot 10^{-3}$	0,07	$2 \cdot 10^{-3}$

(*) n.d.: não detectado

Utilizando substratos distintos nas soluções eletrolíticas, pôde-se observar a partir dos dados da tabela, que a melhor resposta amperométrica foi para o eletrodo EPC/Ppy/lacase, modificado com a presença de lacase de *Aspergillus orizae* (Novozym 51003®), quando foi imerso na solução de fenol. A Figura 21 mostra a comparação dos voltamogramas dos eletrodos, EPC/Ppy/lacase e EPC/Ppy, quando imersos na solução eletrolítica preparada com KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) com fenol ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Observou-se que o eletrodo EPC/Ppy/lacase apresentou um perfil voltamétrico menos definido do que o EPC/Ppy, indicando que a enzima não interfere resposta eletroquímica para o fenol.

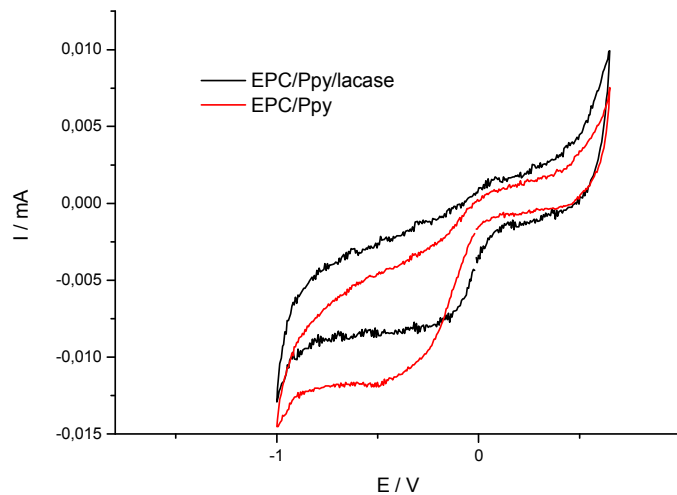


Figura 21 - Voltamogramas cíclicos para eletrodo 1 (com enzima) e eletrodo 2 (sem enzima) de pasta de carbono, comparação dos voltamogramas em solução de fenol $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ mais KCl ($0,3 \text{ mol.L}^{-1}$), $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Na seqüência do trabalho foi estudado o comportamento voltamétrico do eletrodo EPC/Ppy/lacase. Este eletrodo foi caracterizado na presença de diferentes concentrações de fenol: $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$; $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; 2 mmol L^{-1} ; 5 mmol L^{-1} ; 10 mmol L^{-1} ; 20 mmol L^{-1} ; 50 mmol L^{-1} ; 70 mmol L^{-1} e 100 mmol L^{-1} , Figura 22.

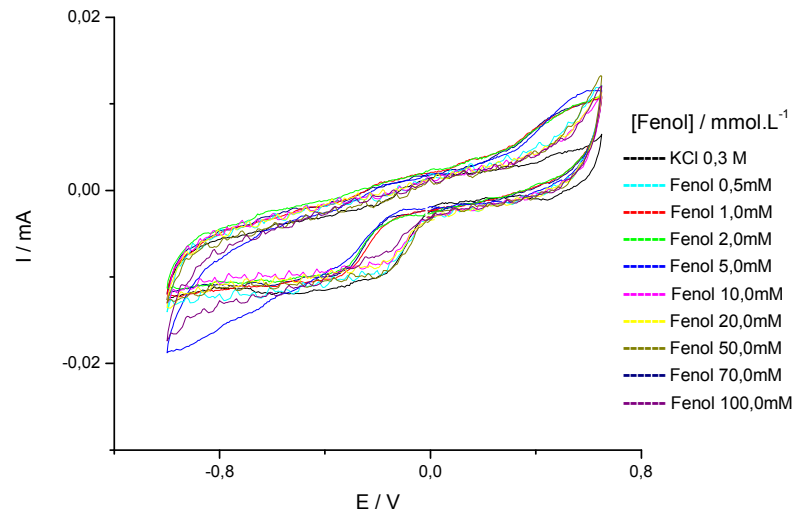


Figura 22 - Voltamogramas cíclicos para eletrodo EPC/Ppy/lacase na presença de diferentes concentrações de fenol, utilizando-se KCl ($0,3 \text{ mol.L}^{-1}$) como eletrólito suporte, $v = 20 \text{ mV/ s}$.

Percebe-se pelos voltamogramas obtidos que, na presença de 5 mmol.L^{-1} de fenol, houve melhor resposta do eletrodo, indicando ser esta a melhor concentração do substrato fenol para a enzima lacase de *Aspergillus oryzae* (Novozym 51003[®]) nestas condições de trabalho.

3.3.2 Efeito da Presença do Modificador nos Eletrodos Utilizando Como Substratos Soluções de Hidroquinona e Benzoquinona

A enzima lacase é capaz de oxidar uma série de compostos tais como: difenóis simples, como a hidroquinona, polifenóis substituídos, aminas aromáticas e benzenodióis (DURÁN, ROSA, D'ANNIBALE, GIANFREDA, 2002).

A hidroquinona é um composto fenólico, de fórmula química $C_6H_4(OH)_2$, muito utilizada como agente orgânico redutor, especialmente em reveladores fotográficos, presentes também em cremes dermatológicos onde atuam como despigmentadores e agentes inibidores da formação de melanina. A literatura traz vários estudos de determinação da hidroquinona, envolvendo técnicas como espectrometria, cromatografia e métodos eletroanalíticos envolvendo eletrodos de pasta de carbono como os trabalhos desenvolvidos por Vieira *et al.* (1999), Rodrigues e Rivas (2002), Vianello *et al.* (2004)

O eletrodo modificado com a presença de lacase (Novozym 51003[®]), EPC/Ppy/lacase foi estudado analisando seu comportamento voltamétrico em soluções de benzoquinona (2 mmol L^{-1}) e Hidroquinona (2 mmol L^{-1}), a voltametria cíclica foi realizada com janela de potencial abrangendo de $-1,0$ a $+0,65 \text{ V}$ e velocidade de varredura 20 mV.s^{-1} , Figura 23.

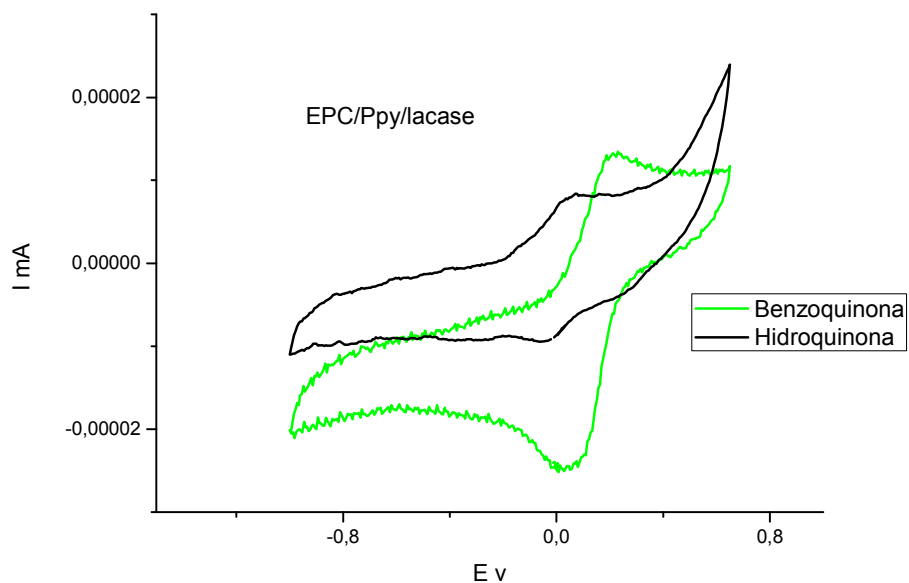


Figura 23 - Voltamogramas cíclicos, comparando a resposta do eletrodo EPC/Ppy/lacase em solução (2 mmol L^{-1}) de Benzoquinona com KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) e em solução (2 mmol L^{-1}) de hidroquinona com KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$), 20 mV.s^{-1} .

De acordo com os voltamogramas obtidos, obteve-se melhor resposta do eletrodo, quando este foi imerso na solução que continha KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) e benzoquinona (2 mmol L^{-1}), visto que o voltamograma correspondente à esta solução apresentou picos de oxidação e redução mais bem definidos.

A benzoquinona é um composto de fórmula química $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2$, possui dois isômeros classificados como *orto*-benzoquinona (benzoquin-1,2-ona) e a *para*-benzoquinona (benzoquin-1,4-ona), este corresponde à forma oxidada da hidroquinona catalisada pela lacase (Novozim 51003[®]), o que deve justificar os comportamentos diferentes para os diferentes compostos, de acordo com os resultados obtidos nos voltamogramas.

3.3.3 Estudo da Influência do pH

Realizou-se um estudo da influência do pH no eletrodo EPC/Ppy/lacase na caracterização eletroquímica da benzoquinona e hidroquinona, utilizando o KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrólito porque o pH exerce grande influência sobre as reações enzimáticas. As enzimas apresentam pH ótimo onde a atividade e a velocidade das reações são máximas, os resultados obtidos variando os valores de pH (2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0) para as soluções eletrolíticas estão representados nas Figuras 24 e 25. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos sob as seguintes condições: velocidade de varredura igual a 20 mV s^{-1} e janela de potencial abrangendo de $-1,0$ à $+0,65\text{V}$.

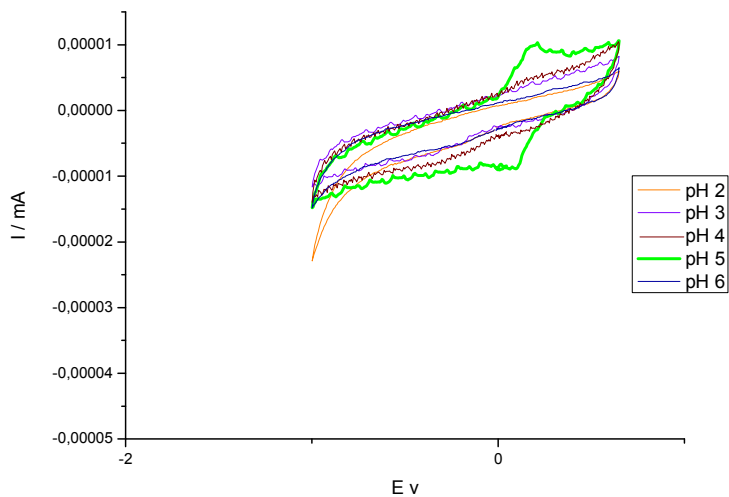


Figura 24 - Voltamogramas cíclicos, do eletrodo EPC/Ppy/lacase em solução de benzoquinona (2 mmol L^{-1}) com KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$), em diversos pHs.

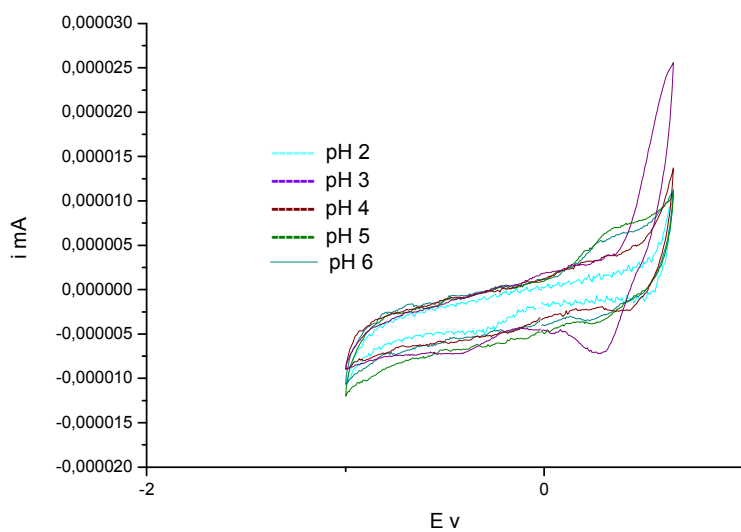


Figura 25 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo EPC/Ppy/lacase em solução de hidroquinona (2 mmol L^{-1}) com KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$), em diversos pHs.

Os resultados obtidos demonstraram que nessas condições de trabalho, no pH 5,0 houve a melhor resposta do eletrodo quando imerso em ambas as

soluções de hidroquinona e benzoquinona, nos outros valores de pH praticamente não foi possível obter valores referentes aos picos de oxidação e redução através dos voltamogramas obtidos.

3.3.4 Efeito da Velocidade de Varredura sobre a resposta voltamétrica do eletrodo modificado.

O efeito da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica do eletrodo, no qual se utilizou o agente biológico modificador, lacase (NOVOZYM 51003[®]), foi investigado em solução de hidroquinona (2 mmol L^{-1}), e de benzoquinona, (2 mmol L^{-1}) ambas em KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) e com pH 5,0. Os resultados obtidos variando a velocidades de varredura ($2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500$ e 1000 mV. s^{-1}), são representados nas Figuras 26 e 27.

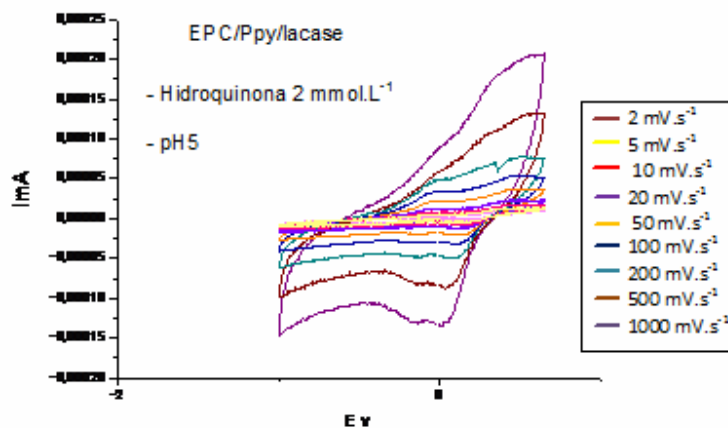


FIGURA 26 – Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura entre 2 e 1000 mV.s^{-1} utilizando o eletrodo em solução de hidroquinona (2 mmol L^{-1}) com KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$), pH 5,0.

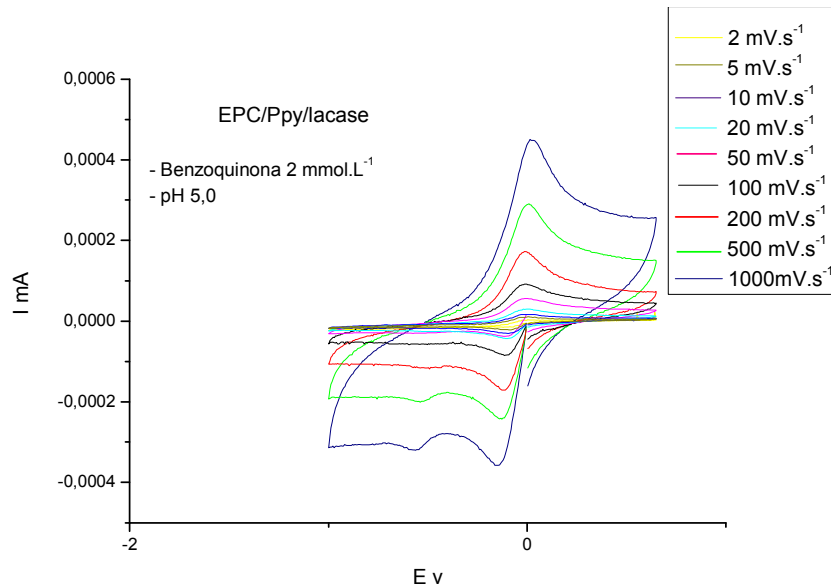


FIGURA 27 – Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura entre 2 e 1000 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ utilizando o eletrodo em solução de benzoquinona (2 mmol L^{-1}) com KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$), pH 5,0.

Com o objetivo de avaliar o grau de reversibilidade e a natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo, construiu-se uma tabela com valores de densidade de corrente de pico ($j_{\text{PC,OX}}$, oxidação e $j_{\text{PC,RD}}$, redução) e dos potenciais de pico ($E_{\text{P,OX}}$, oxidação e $E_{\text{P,RD}}$, redução), para complementar os voltamogramas anteriores, obtidos com variações de velocidade de varredura. Os voltamogramas cíclicos mostraram que, para ambas as soluções de hidroquinona e benzoquinona, o eletrodo modificado com lacase (Novozym 51003[®]) houve um aumento da intensidade da corrente com o aumento da velocidade de varredura.

Gil et al. (2008) investigaram os efeitos do pH (3,0 a 8,0) e da velocidade de varredura ($5 \text{ a } 40 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) para otimização do sensor de pasta de carbono modificada com extrato bruto de lacase (*Pycnoporus sanguineos*) que foi aplicado na

determinação de vários compostos fenólicos, entre eles, a hidroquinona. A resposta do biossensor foi observada através dos valores de corrente de pico catódica obtidos, apresentando maiores valores para o pH de 6,0 a 6,5 e velocidade de varredura igual a 25 mV.s⁻¹.

Tabela 4: Valores de densidade de corrente de pico ($j_{P,OX}$, oxidação e $j_{P,RD}$, redução) e dos potenciais de pico ($E_{P,OX}$, oxidação e $E_{P,RD}$, redução) dos perfis voltamétricos em diferentes velocidades de varredura do eletrodo EPC/Ppy/lacase em solução de benzoquinona (2 mmol L⁻¹) com KCl (0,3 mol L⁻¹), pH 5,0.

V / mV s ⁻¹	Oxidação		Redução		$\frac{ j_{P,OX} }{ j_{P,RD} }$
	$E_{P,OX}$ / V	$J_{P,OX}$ / $\mu\text{A cm}^{-2}$	$E_{P,RD}$ / V	$J_{P,RD}$ / $\mu\text{A cm}^{-2}$	
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	-0,006	0,01	-0,09	-0,21	0,0428
10	-0,007	0,17	-0,10	-0,30	0,5666
20	-0,006	0,29	-0,10	-0,43	0,6744
50	-0,01	0,56	-0,11	-0,38	1,4736
100	-0,01	0,90	-0,10	-0,85	1,0588
200	-0,01	1,72	-0,11	-1,67	1,0299
500	0,01	2,88	-0,12	-2,41	1,1950
1000	0,02	4,53	-0,14	-3,57	1,2689

(*) n.d.: não detectado

Tabela 5: Valores de densidade de corrente de pico ($j_{P,OX}$, oxidação e $j_{P,RD}$, redução) e dos potenciais de pico ($E_{P,OX}$, oxidação e $E_{P,RD}$, redução) dos perfis voltamétricos em diferentes velocidades de varredura do eletrodo EPC/Ppy/lacase em solução de hidroquinona (2 mmol L^{-1}) em KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$), pH 5,0.

V / mV s^{-1}	Oxidação		Redução		$\frac{ j_{P,OX} }{ j_{P,RD} }$
	$E_{P,OX} / \text{V}$	$J_{P,OX} / \mu\text{A cm}^{-2}$	$E_{P,RD} / \text{V}$	$J_{P,RD} / \mu\text{A cm}^{-2}$	
2	nd	nd	nd	nd	
5	-0,05	0,004	-0,01	-0,004	1,000
10	-0,02	0,008	0,12	-0,007	1,1428
20	-0,03	0,12	0,11	-0,12	1,000
50	-0,01	0,21	0,12	-0,21	1,000
100	-0,02	0,33	-0,12	-0,31	1,0645
200	0,50	1,72	0,08	-0,49	3,5102
500	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
1000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

(*) n.d.: não detectado

A natureza do transporte de massa que governa os processos redoxes estudados pode ser conhecida pela relação existente entre a densidade de corrente de pico j_P versus $v^{1/2}$ (Figura 28) que mostra a relação da raiz quadrada da velocidade de varredura (v) e a densidade de corrente dos picos (j_P) de oxidação e redução, para o eletrodo EPC/Ppy/lacase, em solução de benzoquinona (2 mmol L^{-1}) com KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$), pH 5,0.

Observou-se que a densidade de corrente de pico sofreu um aumento não linear com a raiz quadrada da velocidade de varredura. Isto significa que, a transferência eletrônica no filme, presente no eletrodo modificado, parece ser a etapa determinante da velocidade da reação.

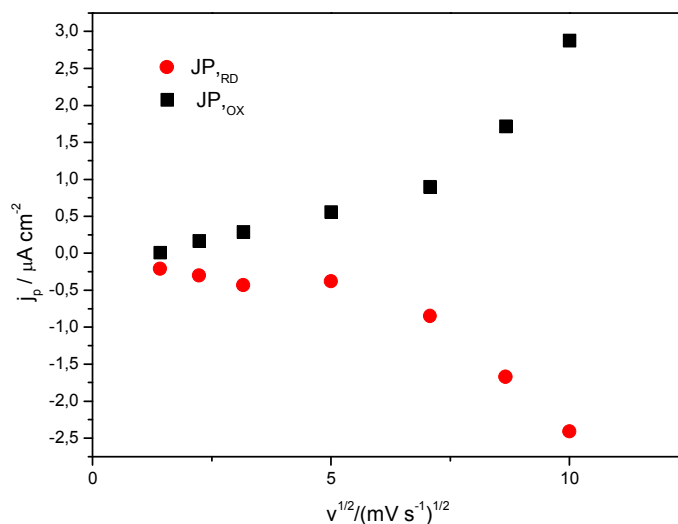


FIGURA 28 – Raiz quadrada da velocidade de varredura (v) e a densidade de corrente dos picos (j_p) de oxidação e redução para o eletrodo EPC/Ppy/lacase em solução de benzoquinona (2 mmol.L^{-1}) com KCl ($0,3 \text{ mol.L}^{-1}$), pH 5,0.

A relação dos resultados obtidos para os valores dos coeficientes angulares (θ) dos gráficos de $\log(j_p)$ versus $\log(v)$, está demonstrada na Figura 29, e vem complementar a figura anterior constatando novamente que o processo ocorrido é de transferência eletrônica.

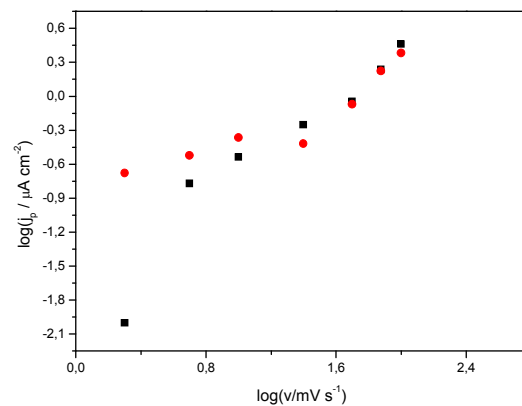


FIGURA 29: Valores de $\log(v)$ versus $\log(j_p)$ para: (■) pico de oxidação e (●) pico de redução para o EPC/Ppy/lacase na presença de benzoquinona.

3.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Pelos voltamogramas obtidos não foi possível realizar uma análise quantitativa para o comportamento eletroquímico dos eletrodos, EPC/Ppy e EPC/Ppy/lacase, porém, através de uma análise qualitativa, observou-se que, o eletrodo que possuía a presença do modificador, enzima lacase do produto Novozym 51003, apresentou melhor resposta amperométrica não acusando diferença significativa pelos substratos, Fenol e ABTS.

O EPC/Ppy/lacase também teve seu comportamento voltamétrico estudado em outras duas soluções, benzoquinona 2 mmol L^{-1} e hidroquinona 2 mmol L^{-1} , utilizando KCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte. Os estudos demonstraram de acordo com os voltamogramas obtidos, que a melhor resposta voltamétrica do eletrodo, foi em solução que continha Benzoquinona, pois o voltamograma que corresponde a esta solução apresentou picos de oxidação e redução mais bem definidos.

Nas condições de trabalho, o pH 5,0 demonstrou ser o melhor valor observado pelo comportamento voltamétrico do eletrodo, para ambas as soluções de

hidroquinona e benzoquinona. Nos demais valores de pH praticamente não foi possível obter valores referentes aos picos de oxidação e redução através dos voltamogramas cíclicos.

O eletrodo modificado com a lacase de *Aspergillus orizae* (Novozym 51003[®]) proporcionou um aumento da intensidade da corrente com o aumento da velocidade de varredura, sendo que a etapa determinante da velocidade da reação foi à transferência eletrônica no filme presente no eletrodo modificado.

CAPÍTULO 4

EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE AMIDO NA ESTABILIZAÇÃO DE ELETRODOS MODIFICADOS COM LACASE UTILIZANDO A TÉCNICA DE “LAYER BY LAYER” (LBL)

4.1 CONSTRUÇÕES DE ELETRODOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE “LAYER BY LAYER” (LBL) PARA IMOBILIZAÇÃO DA LACASE DE ASPERGILLUS ORIZAE.

4.1.1 Introdução

Uma das maiores dificuldades na construção de biossensores enzimáticos está relacionada com a estabilidade da molécula biológica. Uma técnica que tem recebido grande atenção para uma melhor imobilização do biocomponente na construção de biossensores é a de automontagem de policamadas por *Layer-by-Layer* (lbl) por diminuir a desnaturação da enzima, pela fácil construção e baixo custo.

Apesar da grande maioria das referências reportarem o uso da automontagem por lbl baseado nas interações eletrostáticas, também é possível realizar esta deposição por outras interações, como interações biológicas, ponte de Hidrogênio, ligação covalente, entre outras (STOCKON; RUBNER, 1997, ZHAO, 2006).

A lbl por atração eletrostática se resume em sobreposições de espécies com cargas efetivas opostas (Figura 30). As espécies usadas são os polieletrólitos e o material de interesse. (CHAI *et al.*, 2008).

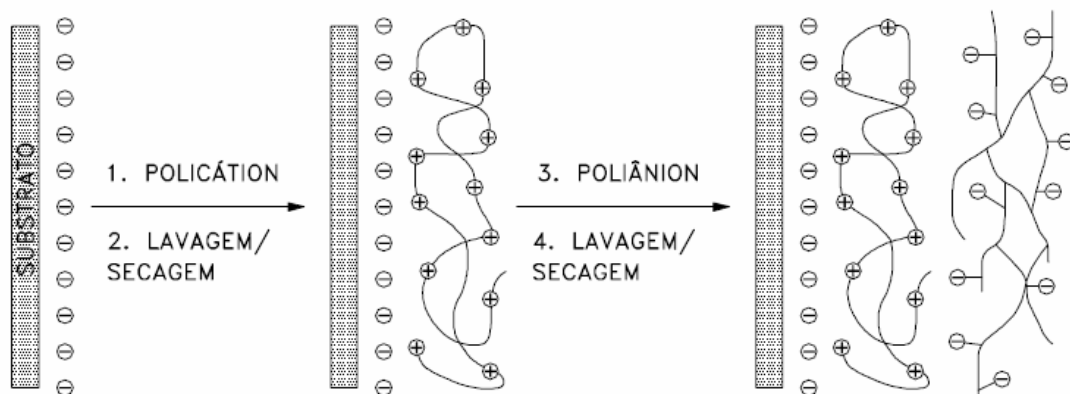


Figura 30 - Ilustração esquemática do método de automontagem via adsorção eletrostática, indicando as etapas de: 1) deposição do polícatión, 2) lavagem e secagem do suporte contendo uma camada de polícatión, 3) deposição do poliânion e 4) contendo camadas alternadas de polícatión e poliânion.

Fonte: (MATTOSO; PATERNO; OLIVEIRA JUNIOR, 2001).

Neste capítulo será abordada a técnica de filmes automontados policamadas por *Layer-by-Layer* (lbl) para a imobilização da enzima lacase. Realizou-se um breve estudo do comportamento eletroquímico dos eletrodos construídos lacase (NOVOZYM 51003[®]), eletrólito PDDA (poly(diallyldimethylammonium chloride) e, amidos de milho e mandioca como alternativas para a imobilização.

A utilização de amido modificado de mandioca surgiu como uma alternativa eficiente e barata em comparação ao amido modificado de milho, utilizado na fabricação de papel.

Acredita-se que o amido de mandioca propicia uma melhor formação de filme e maior rigidez a camada aplicada, sabe-se ainda que o amido de mandioca possui uma cadeia molecular maior que a do amido de milho (VASQUES, 2007).

A técnica de automontagem lbl foi proposta pela primeira vez no início da década de 1980, no trabalho pioneiro de Sagiv (1980) e anos mais tarde, reformulados por Decher e Hong (1991). Esta técnica recebe este nome pois consiste da adsorção espontânea, química ou física de camadas ultrafinas (10 – 100 Å) de materiais sobre a superfície de um suporte sólido, a partir de suas soluções. O tipo de adsorção depende da afinidade entre o suporte e o material, o que está diretamente

relacionado com a estrutura química dos materiais empregados (MATTOSO; MEDEIROS; PATERNO, 2006).

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1 Soluções para Deposição dos Filmes

Para a construção dos eletrodos pela técnica de *layer-by-layer* foram preparadas as seguintes soluções:

- PDDA (poly(diallyldimethylammonium chloride) 2,0 gL⁻¹ pH 5,5:
- Amido de mandioca 2mg/L pH 5,5
- Amido de milho 2 mg/L pH 5,5
- Enzima lacase (NOVOZYM 51003[®]) 2,0 gL⁻¹ pH 5,5

O pH das soluções foi ajustado com soluções diluídas de HCl e KOH. O amido de milho que foi utilizado é o comercial adquirido da marca Maizena Duryea de composição 28% de amilose e 72% amilopectina, porém o amido de mandioca comercial, da marca Yoki, tem uma composição de 17% amilose e 83% amilopectina.

4.2.2 Eletrólitos

Foram preparados eletrólitos para a realização dos testes eletroquímicos.

- KCl 0,1 mol L⁻¹ pH 5,5
- ABTS 2,0 mmol L⁻¹ e KCl 0,1 mol L⁻¹ pH 5,5

4.2.3 Deposição dos Eletrodos

O primeiro eletrodo, foi preparado da seguinte maneira, a lâmina de FTO, foi inicialmente submersa em uma solução de PDDA ($2,0 \text{ mg mL}^{-1}$), com o pH ajustado para 5,5, ficando nesta solução por dez minutos, então foi lavada em água deionizada ultrapura, em seguida foi submersa em uma solução de lacase ($2,0 \text{ mg mL}^{-1}$) com pH também ajustado para 5,5, ficando nesta solução por quinze minutos, então foi lavada, e a lâmina com a primeira bicamada foi seca. A metodologia foi repetida por mais quatro vezes, obtendo assim um filme de 5 bicamadas, Figura 31.

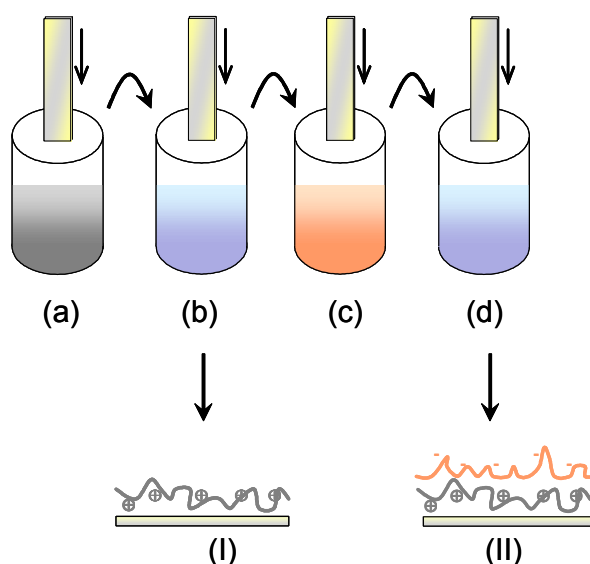


Figura 31 - Representação esquemática do processo de fabricação de filmes nanoestruturados por automontagem utilizando dois polieletrólitos, Lacase e PDDA. O substrato sólido foi imerso em solução (a) da enzima lacase carregada negativamente, durante um tempo de 5 minutos. Logo após, o mesmo substrato foi imerso em água (b) para remover o excesso e moléculas fracamente adsorvidas, completando a formação de uma camada (I). Em seguida, o substrato foi imerso em solução de PDDA (c), o policátion, por 5 minutos, e na seqüência, o excesso de moléculas é novamente removido em água (d). Após cada ciclo, completa-se a formação de uma bicamada (II).

O segundo eletrodo montado foi de $(\text{PDDA}/\text{AMD}/\text{PDDA}/\text{lacase})_5$. A metodologia foi praticamente à mesma, mas foram cinco tetracamadas, sendo que uma

delas foi de amido de milho feita em solução de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$, com o pH ajustado para 5,5, Figura 32.

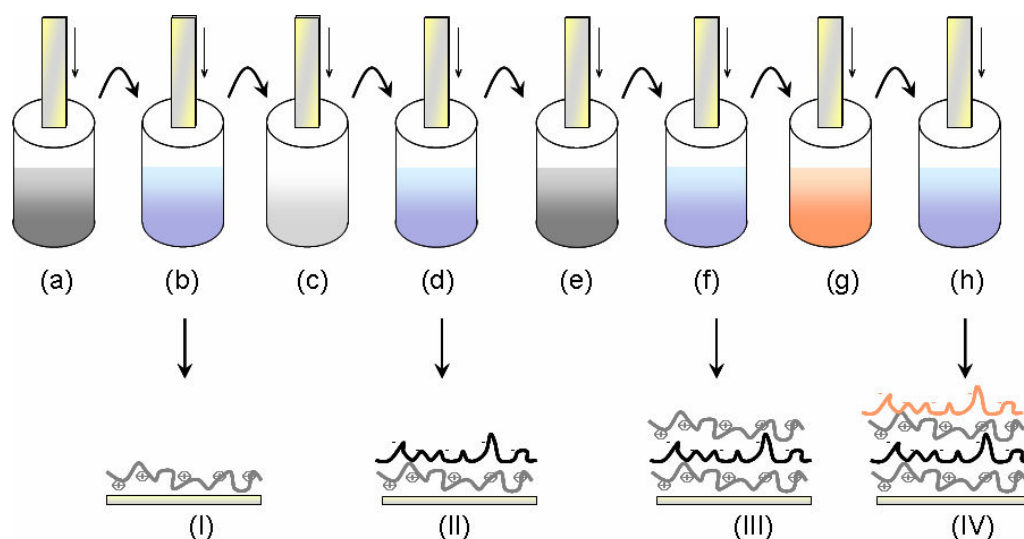


Figura 32- Representação esquemática do processo de fabricação de filmes nanoestruturados por automontagem utilizando polieletrólitos, Lacase, amido de milho e PDDA. O substrato sólido foi imerso em solução (a) do polycátion PDDA, durante 5 minutos. Logo após, o mesmo substrato foi imerso em água (b) para remover o excesso e moléculas fracamente adsorvidas, completando a formação de uma camada (I). Em seguida, o substrato foi imerso em solução de amido de milho (c), carregado negativamente, por 5 minutos, e na seqüência, o excesso de moléculas foi novamente removido em água (d). Uma nova camada de PDDA é depositada pela imersão do eletrodo na solução de PDDA (e) e lavado em água (f), formando a terceira camada (III). Por fim, a lacase foi depositada por atração eletrostática, imergindo o eletrodo na solução contendo lacase (g) e lavado em água na seqüência para eliminar o excesso de material não adsorvido. Após cada ciclo, completa-se a formação de uma tetracamada (IV).

4.3 TESTES ELETROQUÍMICOS

Para avaliar os eletrodos construídos pela técnica “*Layer-by-Layer*”, utilizando FTO (Óxido de Estanho dopado com flúor, Flexitec, resistência $5/\text{cm}^2$) como material sólido de suporte, PDDA (*poly(diallyldimethylammonium chloroyde)*) como polietrólito além dos amidos de milho e mandioca e a lacase, os testes eletroquímicos foram realizados em uma cela eletroquímica em vidro com uma tampa com furos, para

entrada dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar (contra-eletrodo) e para adição de solução. O contra eletrodo utilizado foi de Pt e o eletrodo de referência foi de Ag/AgCl, já o eletrodo de trabalho são os biossensores em estudo.

As voltametrias cíclicas foram realizadas em um potenciostato Microquímica (MQPG-01) interfaciado a um microcomputador, sendo controlado por software, também da Microquímica.

As voltametrias cíclicas foram realizadas em uma janela de potencial de 0,0 à 1,0 V, em uma velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

Como descrito anteriormente, onde foram construídos eletrodos com diferentes configurações, esta diferença esta na ausência (PDDA/lacase) e na presença dos amidos de milho e mandioca (PDDA/AMIDOMILHO/PDDA/lacase e PDDA/AMIDOMANDIOCA/PDDA/lacase).

Inicialmente foi feito o estudo dos eletrodos em eletrólito suporte KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,5 para se conhecer o seu comportamento voltamétrico.

Além das voltametrias dos dois eletrodos, também foi feito da lâmina de FTO limpa, Figura 33.

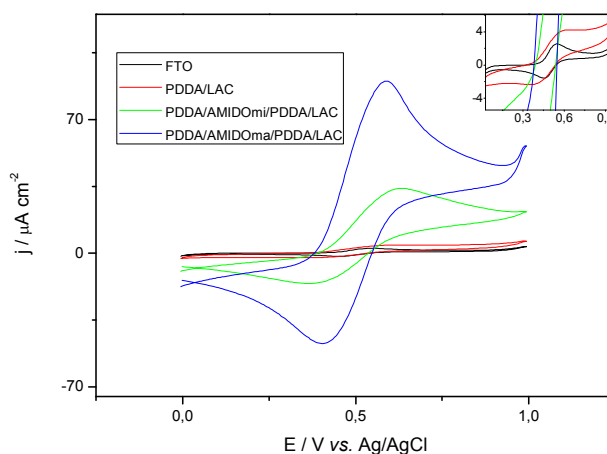


Figura 33 - Voltamogramas cíclicos, lâmina de FTO, (PDDA/lacase) e na presença dos amidos de milho e mandioca (PDDA/AMIDOMILHO/PDDA/lacase e PDDA/AMIDOMANDIOCA/PDDA/lacase), em solução de KCl ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) com ABTS ($2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$), $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Observou-se pelos voltamogramas cíclicos, uma melhor definição dos picos de oxidação e de redução para os eletrodos construídos com as fontes de amidos na imobilização da lacase. O resultado demonstra que para a lâmina de FTO não houve picos de oxidação nem redução, o que se conclui que a lâmina não apresenta corrente de fundo para os eletrodos construídos. Os resultados descritos na Tabela 6 vêm complementar a Figura 33.

Tabela 6: Valores de potenciais de pico ($E_{P,OX}$, oxidação; $E_{P,RD}$, redução) e de correntes de pico ($I_{P,OX}$, oxidação; $I_{P,RD}$, redução) para os voltamogramas dos eletrodos, (PDDA/AMIDOMILHO/PDDA/lacase) e (PDDA/AMIDOMANDIOCA/PDDA/lacase), em solução de KCl ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) com ABTS (2 mmol.L^{-1}).

Eletrodo	Oxidação		Redução	
	$E_{P,OX} / V$	$I_{p,ox} (\mu A)$	$E_{P,RD} / V$	$I_{p,RD} (\mu A)$
(PDDA/AMIDOMILHO/PDDA/lacase)	0,61	34,0	0,39	- 15,0
(PDDA/AMIDOMANDIOCA/PDDA/lacase)	0,58	90,0	0,41	- 47,0

O eletrodo construído com amido de mandioca (PDDA/AMIDOMANDIOCA/PDDA/lacase) demonstrou melhor resposta em consequência de uma melhor estabilidade da lacase no eletrodo.

Na literatura, encontram-se alguns trabalhos que trazem estudos de diferentes fontes de amido empregados na elaboração de biofilmes utilizados pela indústria têxtil. No entanto, não há relatos da utilização de amidos para elaboração de filmes para recobrimento de superfície de eletrodos visando à confecção de biossensores.

4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

A técnica de auto montagem por “*layer-by-layer*” se mostrou eficiente para a construção dos eletrodos.

O comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados demonstrou uma melhor estabilidade do eletrodo construído com o filme elaborado com amido, entretanto, quando se utilizou o amido de mandioca, houve melhor estabilidade do eletrodo em comparação com amido de milho.

Os eletrodos desenvolvidos neste trabalho apresentam baixo custo, facilidade de preparação e os resultados abrem expectativas favoráveis quanto ao uso de amido na elaboração de filmes de superfície de eletrodos modificados.

CONCLUSÕES GERAIS

O eletrodo de pasta de carbono modificado com a lacase, (Novozym 51003[®]) construído neste trabalho apresentou baixo custo e facilidade de construção.

A adição do ABTS à pasta de carbono nos eletrodos como mediador para a ação da enzima lacase se mostrou extremamente efetiva, proporcionando um aumento de aproximadamente oito vezes na resposta amperométrica. Os valores de corrente (I_{pc}) tiveram aumento de 787%-924%, sendo que para o valor ajustado de pH 4,0 do eletrólito, o eletrodo teve a sua melhor resposta voltamétrica.

Para os estudos com os eletrodos modificados com polímero condutor, pirrol, adicionado na pasta de carbono, não foi possível, efetuar uma análise quantitativa para os voltamogramas obtidos, mas, pôde-se verificar melhor resposta voltamétrica do eletrodo modificado com a enzima lacase (Novozym 51003[®]), em solução que continha KCl ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) e benzoquinona (2 mmol L^{-1}), pois o voltamograma que corresponde a esta solução apresentou picos de oxidação e redução mais bem definidos. O mesmo eletrodo, não acusou diferença significativa pelos substratos, fenol e ABTS.

O eletrodo modificado com a lacase (Novozym 51003[®]) proporcionou um aumento da intensidade da corrente com o aumento da velocidade de varredura, sendo que a etapa determinante da velocidade deste processo foi a transferência eletrônica no filme presente no eletrodo modificado.

O estudo realizado para a influência do pH na resposta dos eletrodos de pasta de carbono modificada com a lacase (Novozym 51003[®]) encontrou melhor desempenho em pHs ácido.

A técnica de auto montagem por *layer-by-layer*, é simples e se mostrou eficiente para a construção dos eletrodos, pois para a lamina de FTO, quando submetida a voltametria cíclica, não houve picos de oxidação nem redução e os eletrodos modificados com lacase (Novozym 51003[®]) demonstraram pico de oxidação e redução bem definidos. Os voltamogramas cíclicos demonstraram ainda melhor

estabilidade da enzima no eletrodo construído com amido de mandioca, já que este apresentou melhor resposta amperométrica.

Embora muito já se saiba do uso do amido na indústria alimentícia e mais recentemente pela indústria têxtil, a literatura não traz relatos do conhecimento de eletrodos modificados com filmes elaborados por amidos e suas características eletroquímicas. Neste contexto, nossos resultados abrem expectativas favoráveis quanto ao uso de amido na elaboração de filmes de superfície de eletrodos modificados, visto que, a utilização do amido para a imobilização da lacase (Novozym 51003[®]) através da técnica LbL fez com que o eletrodo apresentasse ótima resposta em decorrência de uma alta estabilidade da enzima.

REFERENCIAS

- AHAMMAD, A. J. S.; LEE, J.; RAHMAN, M. D. A. Electrochemical sensors based on carbon nanotubes. **Sensors**, Basel, v. 9, n. 4, p. 2289-2319, 2009.
- AHUJA, T.; MIR, I. A.; KUMAR, D.; RAJESH. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications, **Biomaterials**, Surrey, v. 28, n. 5, p. 791-805, Feb. 2007.
- ALFAYA, A.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002.
- AMINE, A.; BRETT, C. M. A.; PALLESCI, G. Biosensors for foods safety and environmental monitoring. **Analytical Letters**, v. 37, p. XIII-XIV, 2004.
- ANDRADE, V. M. **Confecção de biossensores através da imobilização de biocomponentes por eletroporimerização de pirrol**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- ARYA, S. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 23, n. 7, p. 1083-1100, Feb. 2008.
- BANKAR, S. B.; BULE, M. V.; SINGHAL, R. S.; ANATHANARAYAN, L. Glucose oxidase: an overview. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 4, p. 489-501, Jul./Aug. 2009.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; St HARDY, G. E.; *Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, Botryosphaeria sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 93- 96, 1996.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Eletrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.
- BELINI, A.; FATIBELLO FILHO, O.; CLEMENTE, E. Construção e aplicação de um Biossensor Amperométrico usando Peroxidase. **Brazilian of the Journal of Food Thecnology**, Campinas, v. 61, n. 4, p. 75-81, 2001.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates: na expanded role for laccase in biodegradation. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 267, n. 1, p. 99-102, Jul. 1990.
- CALL, H. P.; MUCKE, I. History, overview and application of mediated ligninolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozyma-Process). **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 53, n. 2-3, p. 163-202, Mar. 1997.

CAMMANN, K. Continuous: pollution control by chemical sensors. **Sensors and actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 6, n. 1-3, p. 19-24, 1992.

CHAI, R.; YUAN, R.; CHAI, Y.; OU, C., CAO, S.; LI, X. Amperometric immunosensors based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and methylene blue on thiourea modified glassy carbon electrode for determination of human chorionic gonadotropin. **Talanta**, London, v. 74, n. 5, p. 1330-1336, Feb. 2008.

CHEN, J.; WINTHER-JENSEN, B.; LYNAM, C.; NGAMNA, O.; MOULTON, S.; ZHANG, W.; WALLACE, G. A simple means to immobilize enzyme into conducting polymers via entrapment, **Electrochemical Solid-State Letters**, v. 9, n. 7, p. H68-H70, 2006.

CLARKS, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v. 102, p. 29-45, 1962.

COCHE-GUERENTE, L.; COSNIER, S.; INNOCENT, C.; MAILLEY, P. Development of amperometric biosensors based on the immobilization of enzymes in polymer films electrogenerated from a series of amphiphilic pyrrole derivatives. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 311, n. 1, p. 23-30, Jul. 1995.

CONCEICAO, D. M.; DE ANGELIS, D. A.; BIDOIA, E. D.; DE ANGELIS, D. F. Fungos filamentosos isolados do rio atibaia - SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivos Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 99-106, jan./mar. 2005. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V72_1/conceicao.PDF>. Acesso em: 16 abr. 2007.

CORTES, A. P. **Desenvolvimento de biossensores utilizando lacase produzida por Botriosphera Rhodia em compósitos de polímeros condutores e polissacarídeos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

COSNIER, S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films: a review. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 14, n. 5, p. 443-456, May 1999.

COUTO, S. R.; HERRERA, J. L. T. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review; **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, n. 5, p. 500-513, 2006.

DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites, **Science**, Washington, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997.

DECHER, G.; HONG, J. D. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. I. Consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles. **Die Makromolekulare Chemie, Macromolecular Symposia**, New York, v. 46, p. 321-327, 1991.

- DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 28, p. 81-88, 2001.
- DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; Sargent, K. The effect of lignin-related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete, *Botryosphaeria* sp. **Enzyme And Microbial Technology**. v. 30, p. 374-380, 2002.
- DONG, S.; CHEN, X. Some new aspects in biosensors. **Reviews in Molecular Biotechnology**, Oxford, v. 82, n. 4, p. 300-322, Feb. 2002.
- DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, p. 907-931, 2002.
- FABRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase J. Mol. Catal. B: Enzym. v. 16, n. 5, p. 231-240, 2002.
- FATIBELLO FILHO, O.; BARBOSA, A.; LEITE, O. D. Determination of catecholamines in pharmaceutical formulations using a biosensor modified with a Crude Extract of Fungi Laccase (*Pleurotus ostreatus*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 297-303, 2003.
- FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO M. D. Construção e caracterização de um biossensor potenciométrico para determinação de pirogalol. **Química Nova**, São Paulo, v. 15, p. 28-39, 1991.
- FREIRE, R. S.; DURAN, N.; KUBOTA, L. T. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. **Talanta**, London, v. 54, p. 681-686, 2001.
- GE, J.; LU, D.; LIU, Z.; LIU, Z. Recent advances in nanostructured biocatalysts, **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 53-59, Apr. 2009.
- GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors, **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 17, n. 5, p. 345-359, May 2002.
- GIL, E.S.; MULLER, L.; SANTIAGO, M.F.; GARCIA, T.A. "Biosensor Based on Brut Extract from Laccase (*Pycnoporus sanguineus*) for Environmental Analysis of Phenolic Compounds" **Portugaliae Electrochimica Acta**, 27(3), 215-225, 2009.
- GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology, **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 60-72, Apr. 2009.
- GOMES, S. A.; REBELO, M. J. A new lacasse biosensor for polyphenols determination. **Sensors**, Basel, v. 3, n. 6, p.166-175, May/June. 2003. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1424-8220/3/6/166/>>. Acesso em: 4 Abr. 2007.

GONZALES, L., HERNÁNDEZ, J.R., PERESTELO, F., CARNICERO, A. & FALCÓN, M.A. Relationship between mineralization of synthetic lignins and the generation of hydroxyl radicals by laccase and a low molecular weight substance produced by *Petriellidium fusoideum*. **Enzyme and Microbial Technology**. 30: 474-481, 2002.

GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N.; SCHMIDT, C. E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Progress in Polymer Science**, Elmsford, v. 32, n. 8-9, p. 876-921, Aug./Sep. 2007.

JAFFREZIC-RENAULT, N.; DZYADEVYCH, S. V. Conductometric microbiosensors for environmental monitoring. **Sensors**, Basel, v. 8, n. 4, p. 2569-2588, 2008.

JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Amperometric detection of mono- and diphenols at *Cerrena unicolor* laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure. **Talanta**, London, v. 66, n. 5, p. 1219-1224, Jun. 2005.

JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Use of laccase modified electrode for amperometric detection of plant flavonóides. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 35, p.238-241, 2004.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 66, n. 2, p. 524-528, Feb. 2000.

JUNFENG, M. A.; LIHUA, Z.; ZHEN, L.; WEIBING, Z.; YUKUI, Z. Recent advances in immobilized enzymatic reactors and their applications in proteome analysis, **Analytica Chimica Acta**, v. 632, n. 1, Special Section : Life Sciences, 2006.

KOCHANA, J.; NOWAK, P.; WILKOLAZKA, A.J.; BIERON, M. Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. **Microchemical Journal** 89, p. 171–174, 2008.

KRAJEWSKA, B. Ureasas I: functional, catalytic and kinetic properties: a review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 59, n. 1-3, p. 9-21, Jul. 2009a.

_____. Ureasas II: properties and their customizing by enzyme immobilizations: a review, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 59, n. 1-3, p. 22-40, Jul. 2009b.

LIU, Y.; QU, X.; GUO, H.; CHEN, H.; LIU, B.; DONG, S. Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes–chitosan composite. **Biosensors and Bioelectronics**. Vol 21, pp. 2195-2201, 2005.

LEITE, O. D. **Desenvolvimento e aplicação de um biossensor da pasta de carbono modificado com extrato bruto de *Pleurotus ostretus***. 2002. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

LEITE, O. D.; FATIBELLO FILHO, O.; BARBOSA, A. M, Determination of Catecholamines in Pharmaceutical Formulations using a Biosensor Modified with a crude extract of Fungi Laccase (*Pleurotus ostretus*) **Journal of the Brazilian of Chemical Society**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 297-303, 2003.

LIU, Y.; DONG, S. Electrochemical Characteristics of Mediated Laccase-Catalysis and Electrochemical Detection of Environmental Pollutants. **Electroanalysis**, **Vol 20**, pp. 827 – 832, 2008.

LOFRANO, R. C. Z.; QUEIROZ, J. V.; ROMERO, J. R.; Preparation and properties of an electrode with platinum microcrystals dispersed in films of poly(allyl ether p-benzeneammonium derivatives) electrocatalytic hydrogenation of organic substrates. **Journal of Molecular Catalysis**, Amsterdam, v. 174, p. 231-238, 2001.

LOJOU, É.; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. **Journal of Electroceramics**, v. 16, n. 1, 79-91, 2006.

LOUSADA, E. S.; LUCCAS, P. O.; MAGALHÃES, C. S. Construção e caracterização de um biossensor potenciométrico para determinação de pirogalol. **Revista Analytica**, São Paulo, v. 2, n. 11, p. 52, jun./jul. 2004.

MA, J.; ZHANG, L.; LIANG, Z.; ZHANG, W.; ZHANG, Y. Recent advances in immobilized enzymatic reactors and their applications in proteome analysis, **Analytica Chimica Acta**, v. 632, n. 1, p. 1-8, Jan. 2009.

MAJCHERCZYK, A., JOHANNES, C., & HÜTTENNANN, A.. Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediates by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical and dication. **Appl. Microb. Biotechnol.**,v. 51, p. 267-276, 1999.

MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia**: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Artliber, 2006.

MATTOSO, L. H.; PATERNO, L. G.; OLIVEIRA JUNIOR, N. O. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 228-235, 2001.

MEIER, J. L.; BURKAT, M. D., The chemical biology of modular biosynthetic enzymes, **Chemical Society Review** ,v. 38, n. 7, p. 2012–2045, Mar. 2009.

MINUSSI, R.C., PASTORE, G.M. & DURAN, N. Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. **Bioresource Technology**. *In Press*, 2005.

ODACI, D.; TIMUR, S.; PAZARLIOGLU, N.; KIRGÖZ, Ü.; TELEFONCU, A. Effects of mediators on the laccase biosensor response in paracetamol detection. **Biotechnology and applied biochemistry**, vol. 45 (1), pp. 23-28, 2006.

OLIVEIRA, A. C. **Desenvolvimento e aplicação de eletrodos compósitos à base de borracha de silicone e grafite**. 2004. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002.

PEREIRA, A. C., SANTANA, Antonio De., KUBOTA, L.T. *Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas*. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.º.6, p.1012-1021, 2002.

PIONTEK, K.; ANTORINI, M.; CHOINOWSKI, T. Crystal Structure of a Laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90: a resolution containing a full complement of coppers. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 227, n. 40, p. 37663-37669, 2002.

PIOTTO, E. C. S. **Aplicações e técnicas de purificação de lacases fúngicas**. 2003. Monografia (Especialização em Bioquímica Aplicada) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

PITA, M.; SHLEEV, S.; RUSGAS, T.; FERNADEZ, V. M.; YAROLOPOV, A. I.; GORTON, L. Direct heterogeneous electron transfer reactions of fungal laccases at bare and thiol-modified gold electrodes. **Electrochemistry Communications**, New York, v. 8, n. 5, p. 747-753, May 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.html>>. Acesso em: 6 mar. 2006.

PRAKASH, P. A.; YOGESWARAN, U.; CHEN, S. M. A review on direct electrochemistry of catalase for electrochemical sensors. **Sensors**, Basel, v. 9, n. 3, p. 1821-1844, 2009.

QUAN, D.; SHIN, W. S. Modification of electrode surface for covalent immobilization of laccase. **Materials Science & Engineering C-Biomimetic And Supramolecular Systems**. v. 24, p. 113-115, 2004.

RAGHUKUMAR, C.; D'SOUZA-TICLO, D.; VERMA, A. K. Treatment of colored effluents with lignin-degrading enzyme: an emerging role of marine-derived fungi. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 34, n. 3-4, p. 189-206, Jul. 2008.

RAGHUKUMAR, C.; D'SOUZA-TICLO, D.; VERMA, A. K. Treatment of Colored Effluents with Lignin-Degrading Enzymes: an emerging role of marine-derived fungi. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 34, n. 3-4, p.189-206, 2008.

RAZOLA, S. S.; RUIZ; B. L.; DIEZ, N. M.; MARK, H. B.; KAUFFMANN, J. M. Hydrogen Peroxide sensitive amperometric biosensor based horseradish peroxidase entrapped in a polypyrroly electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 17, p. 920-930, 2002.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry, **Trends In Biotechnology**. v. 24, p. 219-226, 2006.

RODRIGUES, H.; CURIEL, J. A.; LANDETE, J. M.; LAS RIVAS, B.; LOPEZ DE FELIPE, F.; GOMES-CORDOVES, C.; MIGU MANCHENO, J.; MUNOS, R. Food phenolics and lactic acid bacteria, **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 132, n. 2-3, p. 79-90, Jun. 2009.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURAN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para a determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.

ROSSATO, S. S. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 1-19, 2001.

SADIK, O. A.; ALUOCH, A. O.; ZHOU, A. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 24, n. 9, p. 2749-2765, May 2009.

SAGIV, J. Organized monolayers by adsorption, i. formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 102, p. 92, 1980.

SANTHIAGO, M.; VIEIRA, I. C. L-Cysteine determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on laccase from *Aspergillus oryzae*. **Sensors and Actuators**, vol. 128, 279-285, 2007.

SARMA, A. K.; VATSYAYAN, P.; GOSWAMI, P.; MINTEER, S. D. Recent advances in material science for developing enzyme electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 24, n. 8, p. 2313-2322, Apr. 2009.

Schneider, P., Carpensen, M.B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, L.K., Ostergaard, P.R., Brown, K.M., Brown, S.H., & Xu, F. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. **Enzyme Microb. Technol.**, 25, 502-508, 1999.

SEGNINI, A. **Uso de pirrolidinoditiocarbamatos de manganês (II) e vanadila na preparação e aplicação de eletrodos de pasta de carbono modificados**. 2003. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)-Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia-Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos.

SEIDEL, M.; NIESSNER, R. Automated analytical microarrays: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 391, n. 5, p. 1521-1544, Jul. 2008.

SHUMAKOVICH, G.P., SHLEEV, S.V., MOROZOVA, O.V., KHOHLOV, P.S., GAZARYAN, I.G. & YAROLOV, A.I. Electrochemistry and kinetics of fungal laccase mediators. **Bioelectrochemistry**. *In Press*, 2006.

SILVA, M. F. **Construção de um biossensor com a enzima polifenol oxidase**. 2004. Monografia (Especialização em Química Industrial) – Fundação Educacional do Município de Assis, Assis.

SILVA, R, C. **Preparação e aplicação de eletrodos de pasta de carbono modificados com ditiocarbamatos para a análise de fármacos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.

SILVA, W. A.; PEREIRA, J.; CARVALHO, C. W. P.; FERRUA, F. Q. Determinação da cor, imagem superficial topográfica e ângulo de contato de biofilmes de diferentes tipos de amidos. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 154-163, jan./fev. 2007.

SINGH, G.; AHUJA, N.; BATISH, M.; CAPALASH, N.; SHARMA, P. Biobleaching of wheat straw-rich soda pulp with alkalophilic laccase from γ -proteobacterium JB: optimization of process parameters using response surface methodology. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 16, p. 7472-7479, 2008.

SOARES, S.; SANCHES, R., DURAN, N.; KUBOTA; L.T. Biossensores amperometricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, São Paulo, vol.24, nº.1, p.77-86, 2001.

SOLOMON. E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN. T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chemical Reviews**, Washington, v. 96, n. 7, p. 2563-2605, 1996.

STOCKON, W.B., RUBNER, M.F., Molecular level Processing of Conjugated Polymers.4. Layer by Layer Manipulation of Polyaniline via Hydrogen-Bonding Interactions. **Macromolecules**, v.30, p. 2717, 1997.

SVANCARA, I.; VYTRAS, K.; BAREK, J.; ZIMA, J. Carbon paste electrodes in modern eletroanalyses. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Boca Raton, v. 31, n. 4, p. 311, 2001.

- TALLMAM, D. E.; PETERSEN, S. L. Composite electrodes for electroanalysis: principles and applications. **Electroanalysis**, New York, v. 2, n. 7, p.499-510, 1990.
- TECON, R.; VAN DER MEER, J. R. Bacterial biosensors for measuring availability of environmental pollutants. **Sensors**, Basel, v. 8, p. 4062-4080, 2008.
- TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors, **Materials Science and Engineering: C**, Lausanne, v. 28, n. 8, p. 1530-1543, Dec. 2008.
- THURSTON, C. F. The structure and function of fungal Laccase. **Microbiology**, Reading, v.140, p.19-26, 1994.
- VASQUES, C. T. **Preparação e caracterização de filmes poliméricos a base de amido de milho e polipirrol para aplicação como biomaterial**. 2007. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- VIANELLO, F.; CAMBRIA, A.; RAGUSA, S.; CAMBRIA, M.T.; ZENARRO, L. & RIGO, A. “ A high sensitivity amperometric biosensor using a monomolecular layer of laccase as biorecognition element”. **Biosensors and Bioelectronics**, 2004.
- VIEIRA, I. C.; FATIBELLO FILHO, O. & ANGNES, L. “Zucchini crued extract palladium-modified carbon paste electrode for the determination of hydroquinone in photographic developers”. **Anal.Chim.Acta**, 398.661, 1999.
- VIEIRA, I. C.; FATIBELLO FILHO, O.; GRANATO, A. C.; LUPETTI, K. O. Titulação amperométrica de compostos fenólicos usando Polifenol oxidase de vegetal como titulante. **Eclética Química**, Marília, v. 29, n. 2, p. 7-17, 2004.
- VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (Cucurbita pepo). **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 39-43, jan./fev. 2003.
- VISWANATHAN, S.; RADECKA, H.; RADECKI, J. Electrochemical biosensors for food analysis. **Monatshefte für Chemie**, Wien, v. 140, n. 8, p.891-899, 2009.
- WANEKAYA, A. K.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Recent biosensing developments in environmental security, **Journal of Environmental Monitoring**, Cambridge, v. 10, n. 6, p. 703-712, May 2008.
- WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**. v. 22, p. 161-187, 2003.
- WIDTEN, P.; KANDELBAUER, A. Laccase applications in the forest products industry: a review, **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 42, p. 293-307, Mar. 2008.

WILLNER, I.; YAN, Y. M.; WILLNER, B.; TEL-VERED, R. Integrated enzyme-based biofuel cells-a review. **FUEL Cells**, v. 9, n. 1, p. 7-24, 2009.

YAROPOLOV, A. I.; SKOROBOGATKO, O. V.; VARTANOV, S. S.; VARFOLOMEYER, S. D. Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, Clifton, v. 49, n. 3, p. 257-280, Dec. 1994.

ZAMBRANO, F.; CAMARGO, C. R. O.; TAVARES, D. Amido de mandioca modificado comparado com substitutos de gordura comerciais. **Brazilian Journal of the Food Technology**, Campinas, v. 4, p. 155-161, 2002.

ZHAO, W.; XU, J. J.; CHEN, H. Y. Electrochemical biosensors based on layer-by-layer assemblies. **Electroanalysis**, New York, v. 18, n. 18, p. 1737-1748, 2006.

ZIMA, J.; SVANCARA, I.; BAREK, J.; VYTRAS, K. Recent advances in electroanalysis of organic compounds at carbon paste electrodes. **Critical Reviews In Analytical Chemistry**, Boca Raton, v. 39, n. 3, p. 204-227, Jul. 2009.