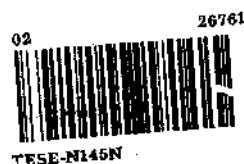


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

UTILIZAÇÃO DE FONTES NATURAIS DE ENZIMAS PARA
CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES

TESE DE DOUTORADO

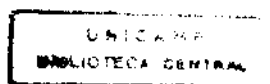


ALUNA: Helena Shizuko Nakatani

ORIENTADOR: Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Oswaldo E. S. Godinho



Campinas
1995



UNIDADE	= 2
N.º UNIDADE	
V	
T. Nº	26761
N.º	002/90

CMOV 82994-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

Nakatani, Helena Shizuko
N145n Utilização de fontes naturais de enzimas para construção
de biossensores / Helena Shizuko Nakatani.-- Campinas,
[SP : s.n.], 1995.

Orientador: Graciliano de Oliveira Neto.
Co-orientador: Oswaldo E. S. Godinho.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química.

I. Biossensores. 2. Catalase. 3. Enzimas imobilizadas.
I. Oliveira Neto, Graciliano. II. Godinho, Oswaldo E. S.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

CURRICULUM VITAE

A. DADOS PESSOAIS

NOME: Helena Shizuko Nakatani

FILIAÇÃO: Kuranoske Nakatani

Yoshie Nakatani

B. FORMAÇÃO ACADÊMICA

1. GRADUAÇÃO:

CURSO: Química

MODALIDADE: Bacharelado e Licenciatura

INSTITUIÇÃO: Universidade Estadual de Londrina

PERÍODO: 1981 - 1985

2. PÓS-GRADUAÇÃO

2.1 MESTRADO EM QUÍMICA ANALÍTICA

INSTITUIÇÃO: Universidade Estadual de Campinas

PERÍODO: 1987 - 1991

TÍTULO: Implicações Termodinâmica e Cinéticas na Titulação Termométrica Catalítica de Ácido Salicílico em Acetona.

2.2 DOUTORADO EM QUÍMICA ANALÍTICA

INSTITUIÇÃO: Universidade Estadual de Campinas

PERÍODO: 1991 - 1995

TÍTULO: Utilização de Fontes Naturais de Enzimas para Construção de Biossensores.

C. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

1. H. S. Nakatani, M. A. Pavan, D. N. Ishikawa e M. Miyazawa, "Avaliação do método espectrofotométrico de absorção atômica para determinação de alumínio em extrato de solos e plantas", Resumos do XX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Belém (Pa), 1985
2. O. E. S. Godinho, H. S. Nakatani, I. M. Raimundo Jr., L. M. Aleixo e G. Oliveira Neto, "Uso da titulometria no estudo das interações envolvendo ácido salicílico e ácido benzóico em acetona", Resumos do V Encontro de Química Analítica, Salvador (Ba), 1989.

3. O. E. S. Godinho, H. S. Nakatani, I. M. Raimundo Jr., L. M. Aleixo e G. Oliveira Neto, "Uso da titulação termométrica catalítica no estudo da reação entre ácido salicílico e hidróxido de potássio em acetona", Resumos do II Encontro de termoanálise, São Paulo (SP), 1989.
4. H. S. Nakatani, G. Oliveira Neto, O. E. S. Godinho, L. M. Aleixo e K. Zinner, "Biossensor construídos pela imobilização de enzimas presentes no líquido lançado pelo besouro bombardeiro - *Pheropsophus aequinoctialis*", Resumos do VIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Campinas (SP), 1992.
5. H. S. Nakatani, O. E. S. Godinho, L. M. Aleixo e G. Oliveira Neto, "Biossensores amperiométrico baseado no tecido de pinhão para determinação de peróxido de hidrogênio", Resumos da 17ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Caxambú (MG), 1994.

D. PUBLICAÇÃO

1. Oswaldo E. S. Godinho, Helena S. Nakatani, Ivo M. Raimundo Jr., Luiz M. Aleixo and Graciliano de Oliveira Neto, "Thermodynamic and Kinetic Implications Involved in the Titration of Polyfunctional Acids by Catalytic Thermometric Titrimetry", *Analyst* 116, 947 (1991).
2. H. S. Nakatani, G. Oliveira Neto, O. E. S. Godinho, L. M. Aleixo and K. Zinner, "Bombardier beetle based biosensor" aceito por *Biosensors & Bioelectronics*.
3. H. S. Nakatani, O. E. S. Godinho, G. Oliveira Neto and L. M. Aleixo, Pine Kernel (*Araucaria angustifolia*) tissue based biosensor for the determination of hydrogen peroxide, a publicar.

Aos Meus Pais

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto, pela orientação e sugestões de grande valia.

Ao Prof. Dr. Oswaldo E. S. Godinho, pela orientação e discussões relevantes.

Ao Prof. Dr. Klaus Zinner, pela doação do extrato enzimático dos besouros bombardeiros utilizado neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz M. Aleixo, pelas sugestões.

À todos amigos do laboratório, pelo carinho e amizade em todos estes anos de convivência.

À Maria de Fátima e Maria José pela amizade.

À todos amigos do Instituto de Química da UNICAMP, pela amizade.

Às amigas Maria Amélia e Tania, pela convivência.

Ao Mário, pela construção da célula de medida.

Ao Julio Cesar pela disposição na elaboração dos trabalhos.

À Helenice e Carlos, pelas sugestões e montagem deste trabalho.

À Iara e a Paula pelas cópias e encardenação deste trabalho.

Ao Instituto de Química da UNICAMP, pela disposição de seus recursos.

Ao CNPq e FAEP, pela concessão de bolsas.

RESUMO

Título: Utilização de fontes naturais de enzimas para construção de biossensores.

Aluna: Helena Shizuko Nakatani

Orientador: Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Oswaldo E. S. Godinho

O fluido de defesa expelido pelos besouros bombardeiros (*Pheropsophus aequinoctialis*) constituído de água oxigenada, hidroquinona, catalase e peroxidase foi utilizado na construção de um biossensor para determinação de peróxido de hidrogênio. O biossensor foi construído pela imobilização direta do extrato enzimático dos besouros bombardeiros, sem prévia purificação, em uma membrana de colágeno utilizando-se glutaraldeído como reagente bifuncional para formação de ligação covalente cruzada. Esta membrana biocatalítica foi acoplada a um eletrodo de oxigênio através de uma rede de nylon e um anel de borracha. O biossensor baseado no extrato enzimático dos besouros bombardeiros apresentou resposta linear na faixa de concentração de $2,0 \times 10^{-4}$ a $2,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio e uma estimativa de desvio padrão relativo de 2%. O tempo de resposta foi de 10 minutos e o extrato enzimático, armazenado em freezer, manteve atividade por 8 meses. Outro biossensor baseado no tecido do pinhão (*Araucaria angustifolia*) que contém catalase, foi construído acoplando-se uma fatia de pinhão na extremidade de um eletrodo de oxigênio. As medidas amperométricas foram realizadas mergulhando-se o biossensor em uma célula com tampa contendo 1,0 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0 e termostaticada à 30,0 °C. A resposta deste biossensor foi linear na faixa de concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ a $2,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio e uma estimativa de desvio padrão relativo de 1,8%. O tempo de resposta foi de 5 minutos e o tecido vegetal manteve atividade enzimática por 8 dias.

ABSTRACT

Title: Utilization of enzymes natural sources for the construction of biosensors.

Student: Helena Shizuko Nakatani

Adviser: Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto

Co-Adviser: Prof. Dr. Oswaldo E. S. Godinho

The ejected fluid by the bombardier beetle (*Pheropsophus aequinoctialis*), as a defensive mechanism against predators, contains hydrogen peroxide, hydroquinone, catalase and peroxidase. A biosensor constructed by combining an oxygen electrode with this fluid ejected was developed for determination of hydrogen peroxide. A biosensor based on the direct immobilization of the enzymes present in the fluid ejected by the bombardier beetle, was prepared by treating a piece of collagen membrane with glutaraldehyde solution. After the immobilization, this membrane was fixed in the side of oxygen electrode by a nylon net and an o-ring. The biosensor based on the fluid ejected by the bombardier beetle presents linear response in the concentration range 2.0×10^{-4} to 2.0×10^{-3} mol.L⁻¹ of hydrogen peroxide and a relative standard deviation of 2%. The response time was 10 minutes and was possible to store in the freezer during 8 months without loss of activity. Another biosensor based on pine kernel (*Araucaria angustifolia*) tissue for the determination of hydrogen peroxide is reported. Pine kernel tissue is used as a source of catalase. The biosensor was constructed by clamping a pine kernel slice on the surface of oxygen electrode. The tissue was kept mechanically in place by a nylon net fixed with an o-ring. All measurements were performed by dipping the biosensor in 1.0 mL of phosphate buffer solution 0.1 mol.L⁻¹, pH 7.0 in a thermostated cell, at 30.0 °C. The response of the pine kernel tissue based biosensor was linear in the concentration range 2.5×10^{-4} to 2.5×10^{-3} mol.L⁻¹ of hydrogen peroxide and a relative standard deviation of 1.8%. The response time was of 5 minutes and catalase activity decreases since from 8th day.

ÍNDICE

Capítulo I	1
APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS	1
Capítulo II	4
PRINCÍPIOS DA ANÁLISE ENZIMÁTICA.....	4
II. 1. Introdução.....	5
II.2. Classificação de enzimas.....	6
II.2.1. Oxidoreduções.....	6
II.2.2. Transferases	7
II.2.3. Hidrolases	7
II.2.4. Liases	8
II.2.5. Isomerases.....	8
II.2.6. Ligases	8
II.3. Atividade enzimática.....	9
II.4. Cinética enzimática.....	10
II.4.1. Equação de Michaelis-Menten.....	10
II.4.2. Equação de Lineweaver-Burk.....	12
II.5. Fatores que afetam a velocidade das reações catalisadas por enzimas	14
II.5.1. Efeito da concentração de substrato.....	14
II.5.2 Efeito da concentração de enzima.....	15
II.5.3. Efeito da temperatura	16
II.5.4. Efeito do pH.....	16

II.5.5. Efeito do sistema tampão - força iônica.....	17
II.5.6. Ativador	17
II.5.7. Inibidor	18
II.5.7.1. Inibição reversível.....	18
II.5.7.2. Inibição irreversível	21
Capítulo III.....	22
IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	22
III.1. Introdução	23
III.2. Métodos de imobilização	24
III.2.1. Oclusão em matriz.....	24
III.2.2. Microencapsulação.....	25
III.2.3. Adsorção	25
III.2.4. Ligação covalente em suporte	26
III.2.5. Ligação covalente cruzada.....	28
Capítulo IV	32
BIOSENSOR.....	32
IV.1. Introdução	33
IV.2. Princípio de um biossensor	36
IV.2.1. Escolha do elemento biológico	36
IV.2.2. Imobilização do elemento biológico.....	36
IV.2.3. Escolha de um transdutor adequado.....	36
IV.2.4. Medida de formação do produto da reação ou do consumo de reagente.	36
IV.3. Característica operacional de um biossensor	37

IV.4. Desempenho analítico de um biossensor	38
IV.4.1. Estabilidade	38
IV.4.2. Tempo de resposta	40
IV.4.3. Seletividade.....	40
Capítulo V.....	41
BIOSSENSORES BASEADOS EM TECIDOS ANIMAIS E VEGETAIS.....	41
V.1. Introdução	42
V.2. Mecanismo de resposta de biossensores baseados em tecidos.....	43
V.3. Biossensores baseados em tecidos animais.....	46
V.4. Biossensores baseados em tecidos de plantas	47
V.4.1. Biossensores baseados em flores.....	47
V.4.2. Biossensores baseados em folhas	48
V.4.3. Biossensores baseados em raízes	48
V.4.4. Biossensores baseados em sementes	49
V.4.5. Biossensores baseados em frutas.....	49
Capítulo VI.....	51
CONSTRUÇÃO DE UM BIOSSENSOR BASEADO NO EXTRATO ENZIMÁTICO DE BESOUROS BOMBARDEIROS (<i>Pheropsophus aequinoctialis</i>).....	51
VI.1. Introdução	52
VI.1.1. Besouros bombardeiros.....	52
VI.1.2. Objetivo	57
VI.2. Parte experimental	58
VI.2.1 Aparelhagem.....	58

VI.2.2. Imobilização das enzimas	58
VI.2.3. Construção do biossensor.....	59
VI.2.4. Procedimento	60
VI.3. Resultados e Discussão	61
VI.3.1. Efeito da quantidade de extrato enzimático imobilizado.....	61
VI.3.2. Efeito do pH	63
VI.3.3. Efeito da temperatura.....	64
VI.3.4. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio	66
VI.3.5. Determinação da constante de Michaelis-Menten aparente.....	68
VI.3.6. Efeito de interferentes	69
VI.3.7. Efeito de envelhecimento do extrato enzimático	70
VI.4. Conclusão	72
Capítulo VII.....	73
CONSTRUÇÃO DE UM BIOSSENSOR BASEADO NO TECIDO DE PINHÃO (<i>Araucaria angustifolia</i>).....	73
VII.1. Introdução	74
VII.1.1 Pinheiros do Paraná	74
VII.1.2. Objetivo.....	77
VII.2. Parte experimental	78
VII.2.1. Aparelhagem.....	78
VII.2.2. Construção do biossensor	78
VII.2.3. Procedimento.....	79
VII.3. Resultados e Discussão.....	80
VII.3.1. Efeito do pH.....	80

VII.3.2. Efeito da temperatura	81
VII.3.3. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio	82
VII.3.4. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio (em unidades de corrente) ..	83
VII.3.5. Determinação da constante de Michaelis-Menten aparente	85
VII.3.6. Efeito de sais	87
VII.3.7. Efeito de interferentes	88
VII.3.8. Tempo de vida do biossensor baseado no tecido de pinhão	89
VII.4. Conclusão	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de uma reação enzimática	11
Figura 2. Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk.....	13
Figura 3. Métodos de imobilização de enzimas	24
Figura 4. Tipos de reações envolvidas no método de imobilização por ligação covalente em suporte.....	27
Figura 5. Alguns reagentes bifuncionais comuns para ligação covalente cruzada com enzima.....	28
Figura 6. Método de imobilização de enzima pelo método de ligação cruzada utilizando o glutaraldeído.....	29
Figura 7. Estrutura do glutaraldeído em solução aquosa, ácida ou neutra.....	30
Figura 8. Reações do glutaraldeído com proteínas	30
Figura 9. Esquema geral de um biossensor.....	35
Figura 10. Representação esquemática dos modelos propostos para a interação substrato e enzima	43
Figura 11. Representação esquemática do sistema de defesa de um besouro bombardeiro.....	54

Figura 12. Reações do sistema de defesa dos besouros bombardeiros e os respectivos catalisadores.....	55
Figura 13. Disparo do jato de um besouro bombardeiro.....	56
Figura 14. Construção do biossensor baseado no extrato enzimático de besouros bombardeiros.....	59
Figura 15. Efeito da quantidade de extrato enzimático imobilizado em membrana de colágeno.....	61
Figura 16. Efeito de pH sobre a resposta do biossensor.....	63
Figura 17. Efeito da Temperatura sobre a resposta do biossensor.....	64
Figura 18. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio.....	66
Figura 19. Determinação de K_m' para o biossensor baseado no extrato enzimático dos besouros bombardeiros.....	68
Figura 20. Efeito de interferentes sobre a resposta do biossensor.....	69
Figura 21. <i>Araucaria angustifolia</i>	76
Figura 22. Construção do biossensor baseado no tecido de pinhão.....	78
Figura 23. Efeito de pH sobre a resposta do biossensor.....	80
Figura 24. Efeito da temperatura na resposta do biossensor baseado no tecido do pinhão ..	81
Figura 25. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio.....	82
Figura 26. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio.....	83

Figura 27. Determinação da constante de Michaelis-Menten aparente para o biossensor baseado em tecido de pinhão	85
Figura 28. Efeito de sais	87
Figura 29. Efeitos de interferentes sobre a resposta do biossensor baseado no tecido de pinhão	88
Figura 30. Tempo de vida do biossensor baseado no tecido de pinhão	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes que podem ser usados para construir um biossensor.....	35
Tabela 2. Fatores que afetam o tempo de resposta de um biossensor.....	41
Tabela 3: Efeito do envelhecimento do extrato enzimático do besouro bombardeiro.....	72

Capítulo I

APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS

A investigação ampla e crescente da utilização de enzimas como reagentes analíticos mostra as novas perspectivas e o sucesso de enzimas na solução de problemas analíticos. A alta seletividade das enzimas, combinada com a alta sensibilidade de medidas eletroquímicas é a razão principal da importância dos eletrodos enzimáticos.

O uso de enzimas para fins analíticos tem sido, muitas vezes, limitado devido a certas desvantagens relacionadas com a estabilidade e custo das enzimas purificadas e, precisão das análises. Estas dificuldades podem ser minimizadas através do desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas e/ou de fontes naturais de enzimas.

O desenvolvimento de biossensores utilizando-se fontes naturais de enzimas apresenta vantagens como a facilidade de obtenção e baixo custo. Em geral, são mais eficientes porque as enzimas em seu ambiente natural tendem a demonstrar maior desempenho. Sempre que possível, substituir uma enzima purificada, de alto custo, por materiais orgânicos naturalmente ricos em enzimas é uma opção atraente. Por isso durante os últimos anos tem tido um interesse crescente no desenvolvimento de novos materiais biocatalíticos para a construção de biossensores. Vários materiais biológicos, tais como, células bacterianas, tecidos animais (fígado de boi e coelho, rim de porco) e de plantas (folhas, flores, sementes) têm sido testadas como componentes biocatalíticos de um biossensor.

Os biossensores baseados em tecidos animais e de plantas são discutidos no capítulo V.

O objetivo deste trabalho consistiu na construção de biossensores utilizando-se fontes naturais de enzimas para determinação de peróxido de hidrogênio. O primeiro biossensor baseia-se na utilização do extrato enzimático dos besouros bombardeiros (*Pheropsophus aequinoctialis*). A imobilização das enzimas, catalase e peroxidase, presentes no jato lançado pelos besouros contra predadores é feita em uma membrana de colágeno utilizando-se o glutaraldeído para formação de ligação covalente cruzada.

O segundo consistiu na construção de um biossensor baseado no tecido de pinhão (*Araucaria angustifolia*). Uma fatia de tecido de pinhão, que contém catalase, é acoplada na extremidade de um eletrodo de oxigênio.

Capítulo II

PRINCÍPIOS DA ANÁLISE ENZIMÁTICA

II. 1. Introdução

As enzimas são catalisadores químicos de origem biológica sintetizadas pelos organismos vivos, que aceleram uma multiplicidade de reações envolvidas nas atividades metabólicas fundamentais das células.

As enzimas são proteínas, moléculas de alto peso molecular, que catalisam as reações biológicas com eficiência. Assim como a maioria dos catalisadores, as enzimas atuam no abaixamento da energia de ativação, acelerando a velocidade da reação permitindo atingir rapidamente o estado de equilíbrio, sem sofrer modificação.

As enzimas demandam condições definidas de operação e estocagem que limitam sua atividade e estabilidade. Elas possuem sítios de ligação muito bem definidos para o substrato (analito), muitas requerem a presença de cofatores que podem estar firmemente ligados à proteína (grupo prostético) ou tem de ser adicionados (coenzimas). As enzimas podem ser facilmente ativadas ou inativadas pela presença de outras substâncias.

As propriedades mais importantes apresentadas pelas enzimas são a seletividade e sensibilidade de suas reações, que permitem um grande potencial de utilização em química analítica (1-5).

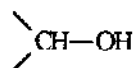
II.2. Classificação de enzimas

Uma classificação sistemática para a identificação de enzimas envolve a subdivisão em seis grupos de acordo com o tipo de reação catalisada (6, 7):

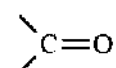
II.2.1. Oxidoreduções

São enzimas que catalisam reações de oxidação e redução. O nome recomendado é, na maioria dos casos, desidrogenase, embora o termo redutase seja, algumas vezes empregado. O nome oxidase é somente utilizado quando O_2 é o aceptor de elétrons. Nesta classe, além de desidrogenase e oxidase, estão incluídas a peroxidase, que utiliza peróxido de hidrogênio como oxidante e, as oxigenases e hidrolases que incorporam oxigênio molecular na molécula que está sendo oxidada.

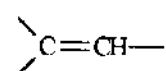
a) Agindo sobre o grupo



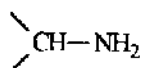
b) Agindo sobre o grupo



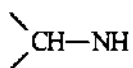
c) Agindo sobre o grupo



d) Agindo sobre o grupo



e) Agindo sobre o grupo



f) Agindo sobre NADH, NADPH

II.2.2. Transferases

São enzimas que catalisam a transferência de um grupo funcional de um composto a outro.

- a) Grupos de um carbono
- b) Grupos aldeídicos ou cetônicos
- c) Grupos acila
- d) Grupos glicosila
- e) Grupos fosfato
- f) Grupos contendo enxofre.

II.2.3. Hidrolases

São enzimas que catalisam reações de hidrólise.

- a) ésteres
 - b) ligações glicosídicas
 - c) ligações peptídicas
 - d) outras ligações C-N
 - e) anídridos acéticos.
-

II.2.4. Liases

São enzimas que quebram a dupla ligação por eliminação.

- a) >C=C<
- b) >C=O
- c) >C=N-

II.2.5. Isomerases

São enzimas que catalisam o rearranjo intramolecular (reações de isomerização).

Dependendo do tipo de isomeria são chamadas de:

- a) racemases
- b) cis-trans-isomerases

II.2.6. Ligases

São enzimas que catalisam a ligação de duas moléculas acopladas com hidrólise de uma ligação pirofosfato em ATP ou um trifosfato similar.

- a) C-O
- b) C-S
- c) C-N
- d) C-C

II.3. Atividade enzimática

A concentração de uma enzima em um material não é expressa em termos clássicos, como mg.L^{-1} , porque somente uma quantidade muito pequena de enzima cataliticamente ativa, pode estar presente em uma dada massa deste material. Estas medidas são apresentadas em unidades de atividade enzimática.

A unidade de atividade enzimática é estabelecida através da medida da velocidade de reação à partir de uma quantidade de substrato consumido ou produto formado, num determinado tempo e temperatura. A mais aceita é a unidade internacional (1 U) de enzima, definida como a quantidade que catalisa a transformação de um micromol de substrato por minuto, sob condições definidas.

A atividade específica de uma enzima é expressa como unidades de enzimas por miligrama de proteína (U/mg de proteína). É uma medida da pureza da enzima, aumentando durante a sua purificação e tornando-se máxima e constante quando a enzima estiver em seu estado puro.

A atividade molecular é definida como o número de moléculas de substrato transformadas por minuto por molécula de enzima. Já a concentração de uma enzima em solução, pode ser expressa como unidades por mililitro (U/mL).

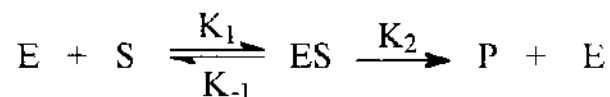
Outra unidade de atividade enzimática é o Katal, definida como a quantidade de atividade enzimática que transforma um mol de substrato por segundo (8, 9).

II.4. Cinética enzimática

II.4.1. Equação de Michaelis-Menten

Uma teoria geral de cinética das reações catalisadas por enzimas foi desenvolvida por Michaelis-Menten e, mais tarde, ampliada por Briggs e Haldane.

A teoria de Michaelis-Menten considera que a enzima se combina com o substrato para formar o complexo intermediário enzima-substrato e depois, se rompe para formar o produto e regenerar a enzima. Para uma reação enzimática, envolvendo apenas um substrato, tem-se a seguinte expressão geral:



onde E representa a enzima, S é o substrato, ES é o complexo intermediário enzima-substrato, P é o produto formado, K_1 , K_{-1} e K_2 são as constantes de velocidade das reações indicadas.

A equação de Michaelis-Menten expressa as relações matemáticas entre a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzimas, a concentração de substrato e outras características da enzima (7, 10).

Para uma concentração fixa de enzima, a velocidade de uma reação enzimática é dada pela seguinte equação de Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

onde V representa a velocidade da reação, V_{\max} é a velocidade máxima, quando toda enzima está presente como ES , logo, é igual a $K_2[E]$, $[S]$ é a concentração de substrato e K_m é a constante de Michaelis-Menten, que é igual a

$$\frac{K_{-1} + K_2}{K_1}$$

Os valores das constantes cinéticas K_m e V_{\max} , podem ser obtidas através do gráfico da velocidade em função da concentração de substrato, como mostra a Figura 1. A Figura mostra, também, a dependência da velocidade de reação com a concentração de substrato.

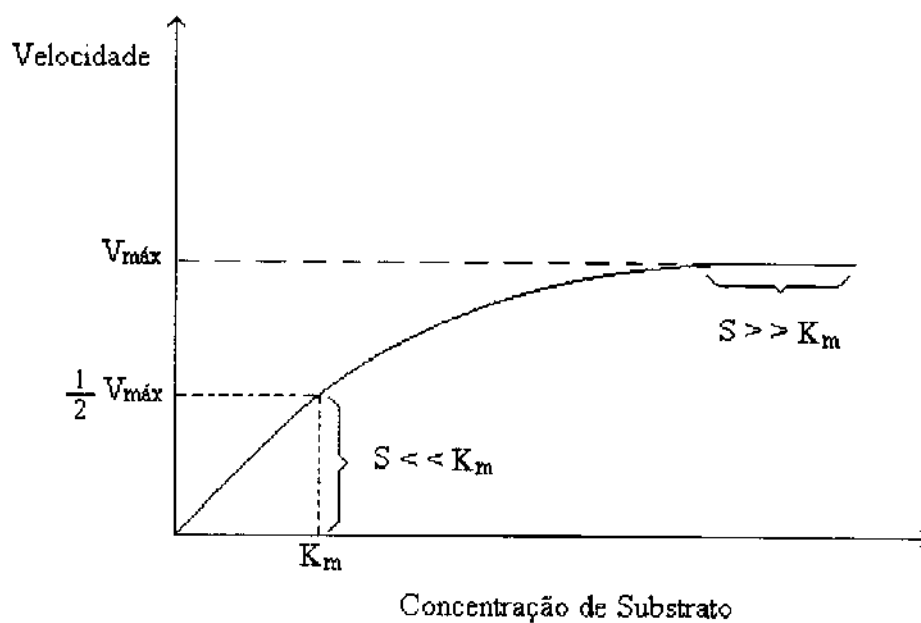


Figura 1. Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de uma reação enzimática.

Para uma concentração fixa de enzima, a velocidade de uma reação enzimática aumenta com o aumento da concentração de substrato até atingir um valor limite, a partir do qual a adição de mais substrato não afeta mais a velocidade.

Quando a velocidade da reação atinge a metade da velocidade máxima, $V = \frac{V_{\max}}{2}$,

o coeficiente de Michaelis-Menten (K_m) será igual a concentração de substrato.

O coeficiente de Michaelis-Menten indica o grau de afinidade da enzima pelo substrato; quanto menor o K_m , maior será a afinidade da enzima pelo substrato.

II.4.2. Equação de Lineweaver-Burk

A equação de Michaelis-Menten pode ser transformada em outras formas, mais úteis para se obter os valores de K_m e V_{\max} . Uma transformação é obtida através da linearização da equação de Michaelis-Menten.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

onde V_0 é a velocidade inicial da reação.

Esta equação é chamada de equação Lineweaver-Burk.

Quando é traçado um gráfico de $1/V_0$ em função de $1/[S]$, obtém-se uma reta com coeficiente angular de K_m/V_{\max} , com intersecção de $1/V_{\max}$ no eixo de $1/V_0$ e de $-1/K_m$ no eixo de $1/[S]$, como mostra a Figura 2.

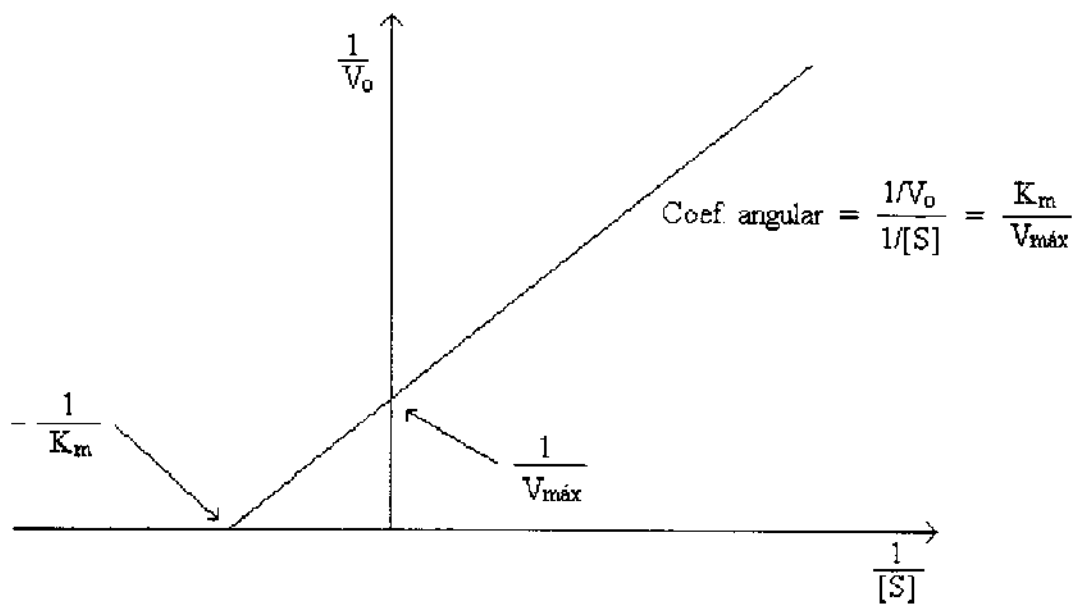


Figura 2. Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk.

II.5. Fatores que afetam a velocidade das reações catalisadas por enzimas

Os principais fatores que afetam a cinética de reações catalisadas por enzimas são: concentração de substrato, concentração de enzima, temperatura, pH, solução tampão, força iônica, ativadores e inibidores(5, 7, 11, 12).

II.5.1. Efeito da concentração de substrato

O efeito da concentração de substrato em reações catalisadas por enzimas é dado pela equação de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

A velocidade de uma reação enzimática é diretamente proporcional à concentração de substrato. A velocidade da reação aumenta até atingir um valor limite.

Para baixas concentrações de substrato, $[S] \ll K_m$ (região linear do gráfico apresentado na Figura 1), a reação enzimática apresenta a cinética de primeira ou pseudo primeira ordem com relação ao substrato. A equação de Michaelis-Menten se reduz a:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m}$$

Para altas concentrações de substrato, $S \gg K_m$, a reação é de primeira ordem em relação a enzima e de ordem zero em relação ao substrato. A equação de Michaelis-Menten se reduz a:

$$V = V_{\max}$$

A altas concentrações de substrato observa-se, também, um decréscimo na velocidade da reação, não previsto na equação de Michaelis-Menten. Esta inibição pode ser devido a formação de um complexo não efetivo com duas ou mais moléculas de substrato combinando com o sítio ativo. Isto é observado com enzimas que possuem dois ou mais grupos, cada um combinando com uma parte da molécula de substrato. Em um complexo efetivo, uma molécula de substrato está combinado com todos estes grupos. Se algum destes grupos é bloqueado com outras moléculas, pode ser formado um complexo não efetivo no qual um substrato combina-se com somente um grupo da enzima. A probabilidade de formação de um complexo não efetivo aumenta com o aumento da concentração de substrato, onde a molécula de substrato tende a se aglomerar sobre as enzimas.

II.5.2 Efeito da concentração de enzima

A velocidade de uma reação enzimática é função da concentração da enzima de acordo com a equação de Michaelis-Menten:

$$V = \frac{K_2 \cdot [E] \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Teoricamente, uma aumento na velocidade de reação é proporcional ao aumento na concentração de enzima. Entretanto, às vezes, é observado um desvio da linearidade para concentrações altas de enzima, o que pode não significar um decréscimo na atividade da enzima, mas, uma limitação na técnica de medida.

II.5.3. Efeito da temperatura

A velocidade das reações químicas geralmente aumenta à medida que se eleva a temperatura. Um aumento na temperatura implica em uma energia cinética maior às moléculas do reagente, ocasionando um maior número de colisões por unidade de tempo.

As reações catalisadas por enzimas se comportam até certo ponto, de modo similar. As enzimas são moléculas protéicas complexas e a atividade catalítica das enzimas é proveniente de uma estrutura terciária precisa, altamente ordenada que justapõe os grupamentos específicos dos aminoácidos de modo a formar sítios estereoespecíficos de ligação com o substrato e o centro catalítico.

Se a enzima absorver muita energia, a estrutura terciária romper-se-á e a enzima perde sua atividade catalítica. Este processo é denominado de desnaturação. Desta forma, à medida que se eleva a temperatura, o aumento esperado na velocidade resultante do aumento das colisões entre enzima e substrato é compensado pelo aumento da velocidade de desnaturação. Conseqüentemente, o gráfico de velocidade para sistemas enzimáticos, geralmente, apresenta-se em forma de sino. A “temperatura ótima” para uma determinação é a temperatura em que a enzima possui atividade máxima.

Um controle rigoroso de $\pm 0,1$ °C é, geralmente, suficiente para obter resultados reprodutíveis.

II.5.4. Efeito do pH

As enzimas, sendo proteínas, apresentam propriedades que são bastante sensíveis ao pH. De fato, muitas enzimas são ativas somente dentro de uma faixa estreita de pH.

A forma do perfil de atividade em função do pH varia com a concentração de substrato, uma vez que a constante de Michaelis-Menten, da maioria das enzimas, se altera com o pH. Estas curvas serão mais significativas se a enzima for mantida saturada com o

substrato em todos os valores de pH estudados. Nos estudos de cinética enzimática, o pH é mantido constante no seu valor ótimo.

O pH ótimo de uma enzima não é necessariamente idêntico ao pH de seu meio intracelular normal, que pode estar situado na parte ascendente ou descendente de seu perfil de atividade em função do pH. Isso sugere que a inter-relação pH-atividade enzimática, pode ser um fator de controle intracelular da atividade da enzima.

II.5.5. Efeito do sistema tampão - força iônica

A atividade de uma enzima depende não somente de pH mas, também, do tipo de solução tampão empregado.

O sistema tampão pode não somente afetar a atividade mas, também, a estabilidade de uma enzima devido às cargas, ativação de ânions e mudanças na superfície.

A força iônica afeta a reação enzimática através da mudança no estado de equilíbrio da reação.

Para obter resultados reprodutíveis deve-se eliminar íons interferentes e controlar a força iônica para assegurar a concentração efetiva dos reagentes.

II.5.6. Ativador

Um ativador é uma substância necessária para a enzima tornar-se um catalisador ativo ou, ainda, uma substância para aumentar o poder catalítico de uma enzima. Geralmente, a ativação não é específica, uma mesma enzima pode ser ativada por várias substâncias diferentes.

O efeito da concentração de um ativador sobre a velocidade de uma reação enzimática é similar àquela da concentração de substrato. Para baixa concentração do ativador, há uma dependência de primeira ordem da velocidade sobre a concentração do ativador. Para altas concentrações do ativador, a velocidade da reação independe da concentração de ativador.

Alguns ativadores são íons metálicos simples como Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} ou podem ser substâncias orgânicas complexas.

II.5.7. Inibidor

Um inibidor enzimático é uma substância que causa um decréscimo na velocidade de uma reação catalisada por enzima através da reação com a enzima formando o complexo enzima-inibidor ou pela reação do inibidor com um dos reagentes.

Os inibidores enzimáticos podem ser divididos em dois tipos: reversíveis e irreversíveis.

II.5.7.1. Inibição reversível

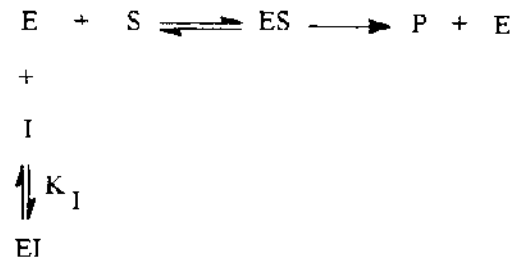
Na inibição reversível, o inibidor participa em uma reação reversível com a enzima ou o complexo enzima-substrato que atinge rapidamente o equilíbrio. Este equilíbrio pode ser analisado em termos da equação de Michaelis-Menten.

Neste tipo de inibição, a enzima pode recuperar sua atividade quando o inibidor é removido.

Os inibidores reversíveis podem ser divididos em três tipos: competitivos, acompetitivos e não competitivos.

O inibidor competitivo pode se combinar com a enzima competindo com o substrato pelo sítio ativo. A molécula do inibidor não é quimicamente alterada pela enzima.

Um inibidor competitivo reage reversivelmente com a enzima para formar um complexo enzima-inibidor (EI), análogo ao complexo enzima-substrato (ES).



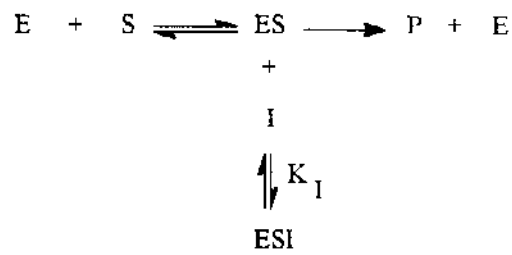
A constante do inibidor (K_I) é uma constante de dissociação do complexo enzima-inibidor e, pode ser definida como:

$$K_I = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

A presença de um inibidor competitivo aumenta o coeficiente de Michaelis-Menten aparente da enzima para o substrato, porque torna necessária uma concentração maior de substrato para atingir sua velocidade máxima. O coeficiente angular é aumentado por um fator de $\frac{1 + [I]}{K_I}$. Porém, um inibidor competitivo não afeta a velocidade máxima, o que

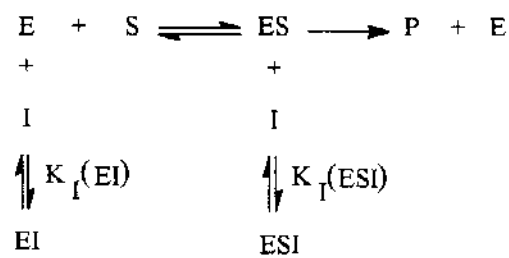
mostra que o inibidor não interfere na velocidade de desdobraimento do complexo enzima-substrato.

Na inibição incompetitiva, o inibidor não se combina com a enzima nem afeta sua reação com o substrato, porém, se combina com o complexo enzima-substrato originando um complexo inativo enzima-substrato-inibidor, incapaz de sofrer a etapa subsequente da reação para produzir o produto.



A constante do inibidor, K_I , é $K_I = \frac{[ES] \cdot [I]}{[ESI]}$

Um inibidor não competitivo pode combinar tanto com a enzima livre quanto com o complexo enzima-substrato, interferindo na ação de ambos. Neste tipo de inibição, a reação com o inibidor produz duas formas inativas, EI e ESI.



A constante de inibidor para EI é:

$$K_I(EI) = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

e, para ESI é:

$$K_I(ESI) = \frac{[ES] \cdot [I]}{[ESI]}$$

II.5.7.2. Inibição irreversível

Na inibição irreversível, o inibidor liga-se fortemente à enzima, dissociando-se muito lentamente.

Algumas enzimas sofrem inativação irreversível quando tratadas com agentes capazes de modificar, através da ligação covalente, um grupo funcional necessário para catálise tornando a molécula enzimática inativa.

Muitas vezes, a inibição irreversível ocorre lentamente quando comparada com a cinética de reação enzimática sem inibidores, de modo que, inicialmente a inibição é incompleta, porém, aumenta continuamente com o tempo, devido à modificação química de uma fração progressiva de moléculas enzimáticas.

Este tipo de inibição não pode ser analisada pelo princípio de Michaelis-Menten, que considera a formação de complexos, EI ou ESI, como reversíveis.

Capítulo III

IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

III.1. Introdução

O uso de enzimas para fins analíticos tem sido limitado devido a certas desvantagens relacionadas à estabilidade e custo das enzimas e, precisão das análises. Além disso, soluções aquosas de enzimas, muitas vezes, perdem sua atividade catalítica muito rapidamente e, as enzimas não podem ser recuperadas de tais soluções nem ter suas atividades regeneradas.

Estas dificuldades podem ser diminuídas através do desenvolvimento das técnicas de imobilização de enzimas. A enzima livre é imobilizada ou insolubilizada, junto a uma matriz inerte, de tal forma que conserve suas propriedades catalíticas por um tempo mais longo do que na forma livre e, podendo ser utilizada continuamente, em um maior número de análises.

A imobilização de enzimas é considerada um procedimento bem sucedido para aumentar sua estabilidade, implicando num decréscimo na constante de velocidade de inativação ou um aumento no tempo de inativação sob condições de desnaturação (13). A estabilidade operacional de um sistema baseado em enzimas, definida como eficiência de conversão após a operação por diferentes períodos, não depende somente da própria enzima mas, também, da estabilidade do suporte, do procedimento de imobilização e do tipo de ativadores e inibidores presentes.

A imobilização não deve desnaturar o centro ativo das enzimas devendo, portanto, ser feita através de grupos que não estão envolvidos nas atividades catalíticas. Existem muitos métodos de imobilização de enzimas relatados na literatura (8, 14-20).

III.2. Métodos de imobilização

Os métodos de imobilização de enzimas podem ser divididos nas seguintes categorias: oclusão em matriz, microencapsulação, adsorção, ligação química covalente em suporte e ligação química covalente cruzada (8, 14-20). A Figura 3 ilustra estes métodos de imobilização.

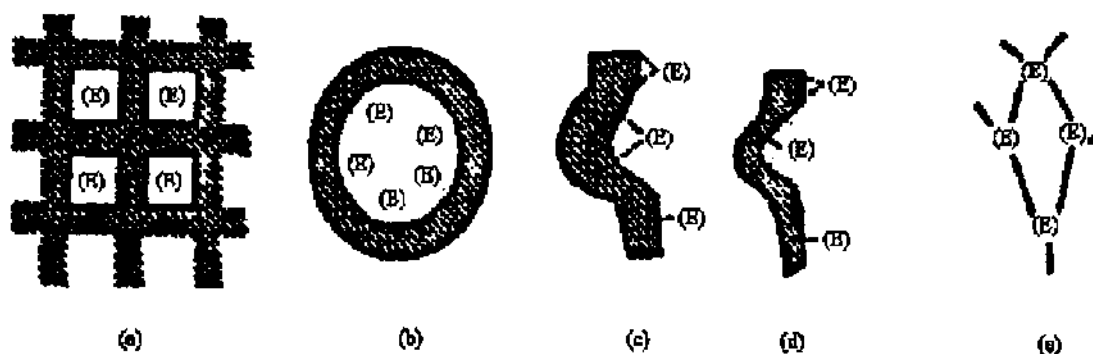


Figura 3. Métodos de imobilização de enzimas: (a) oclusão em matriz, (b) microencapsulação, (c) adsorção, (d) ligação covalente em suporte e (e) ligação covalente cruzada.

III.2.1. Oclusão em matriz

O método da oclusão envolve o aprisionamento da enzima dentro de espaços intersticiais da ligação covalente cruzada de polímero insolúvel (agar-agar, álcool polivinílico, amido, poliacrilamida e outros).

Nesta imobilização, o monômero, o catalisador de polimerização e a enzima a ser ocluída são misturados em uma solução tampão juntamente com um catalisador adequado. A estrutura do polímero formada apresenta espaços intersticiais pequenos que permitem somente a difusão de moléculas menores do substrato.

A vantagem deste método de imobilização é que a reação entre o substrato e a enzima não sofre modificação, porque esta imobilização praticamente não altera sua estrutura. Entretanto apresenta como desvantagem, uma redução do tempo de vida útil do sensor, devido a perda de parte da enzima imobilizada causada pela variação do tamanho dos poros intersticiais do polímero.

III.2.2. Microencapsulação

O método da microencapsulação envolve o confinamento de enzimas em microcápsulas (pequenas esferas) com membranas semi-permeáveis de poros variando de 5 a 300 μm , que permitem somente a livre movimentação de substrato e produto da reação enzimática (21).

Este tipo de imobilização de enzimas difere da anterior porque permite o aprisionamento de um volume ou número de moléculas maior.

A vantagem deste método é a possibilidade de se imobilizar simultaneamente várias enzimas em apenas uma etapa. Entretanto, a necessidade de alta concentração de proteína para microencapsulação e a dificuldade de se fixar essas microcápsulas na base do sensor tem dificultado sua aplicação.

III.2.3. Adsorção

A adsorção de uma enzima sobre um suporte insolúvel é o método mais simples de imobilização. Esta adsorção de enzimas resulta em interações do tipo iônico, polar ou pontes de hidrogênio. Os suportes insolúveis, geralmente, possuem superfície ativa e funcionam como excelentes adsorventes (22).

Os adsorventes mais comumente usados são o vidro, carvão vegetal, sílica gel, alumina entre outros.

A principal vantagem deste método é a sua simplicidade, porém, a enzima adsorvida não está firmemente ligada ao suporte, é extremamente dependente do pH, do substrato, do solvente e da temperatura. Assim sendo, a adsorção pode ser bastante afetada por estes fatores.

III.2.4. Ligação covalente em suporte

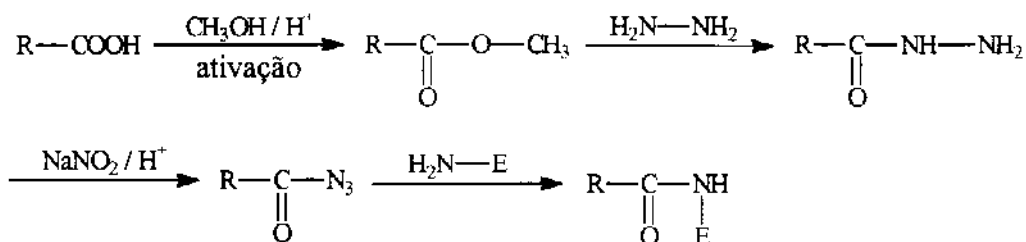
Neste caso, a imobilização em suporte insolúvel é feita através da ligação covalente de grupos funcionais não ativos da enzima e grupos reativos (hidroxila, carbonila, amino, fenólico) ligados na superfície do suporte insolúvel. Esta ligação deve ser realizada sob condições que não causem desnaturação da enzima.

Os tipos de reações envolvidas no método de imobilização de enzimas por ligação covalente em suporte são mostrados na Figura 4.

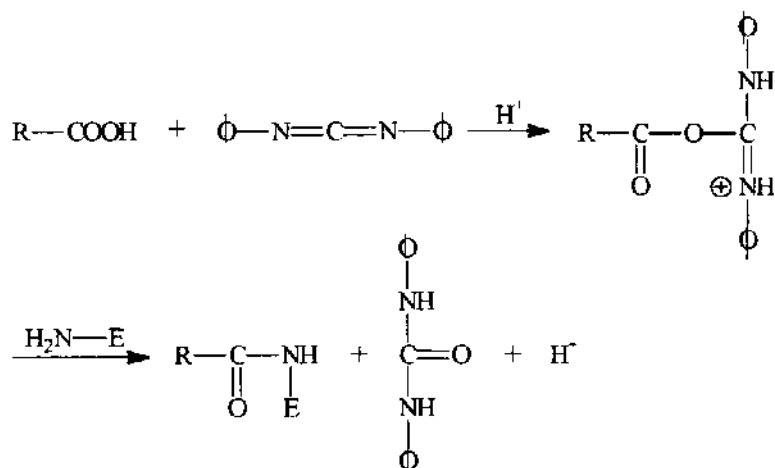
Os suportes insolúveis mais utilizados são os polímeros sintéticos (agar-agar, celulose, colágeno, amido) e materiais inorgânicos (pérolas de vidro com porosidade controlada).

No método de ligação covalente em suporte a enzima é mantida num ambiente semelhante ao encontrado na natureza, proporcionando uma maior estabilidade e, também, menor susceptibilidade aos efeitos de pH, força iônica, solvente e temperatura.

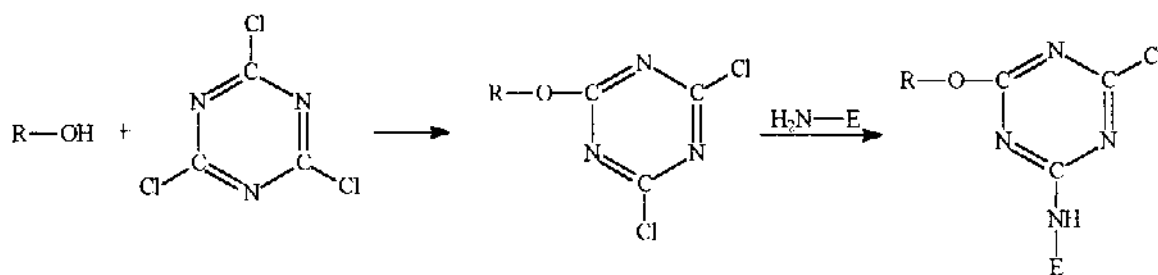
via grupos azida



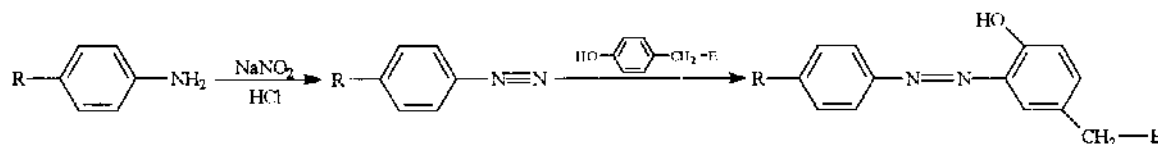
via carbodiimida



via cloreto cianúrico



via grupos diazônico



via grupos tiol

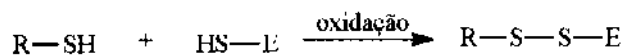


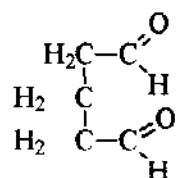
Figura 4. Tipos de reações envolvidas no método de imobilização por ligação covalente em suporte.

III.2.5. Ligação covalente cruzada

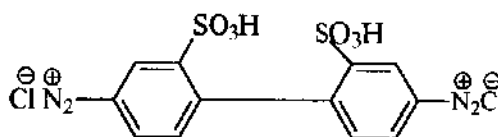
Reagentes bifuncionais são utilizados para imobilizar enzimas e/ou outras proteínas. Os reagentes bifuncionais são divididos em duas classes: homofuncionais, possuem dois grupos funcionais iguais e, heterofuncionais, se os dois grupos forem diferentes.

O método baseia-se na formação de partículas devido à ligação covalente cruzada formada entre as moléculas das enzimas e/ou moléculas do suporte inerte com reagentes bifuncionais.

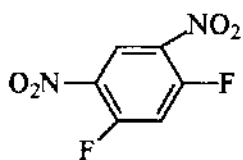
Alguns reagentes bifuncionais utilizados para a formação da ligação covalente cruzada intermolecular são mostrados na Figura 5.



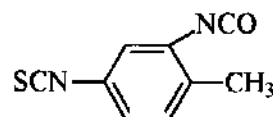
Glutaraldeído



Ácido bisdiazobenzidina 2, 2' dissulfônico



1, 5 - difluor 2, 4 dinitrobenzeno



2, 2 - isocianato 4 - isotiocianato tolueno

Figura 5. Alguns reagentes bifuncionais comuns para ligação covalente cruzada com enzima.

O método de imobilização com o glutaraldeído é mostrado na Figura 6. Este método tem sido muito utilizado porque a enzima é, geralmente, mantida num ambiente semelhante ao encontrado na natureza, proporcionando maior estabilidade e, também, menor susceptibilidade às variações de pH, força iônica, solvente e temperatura.

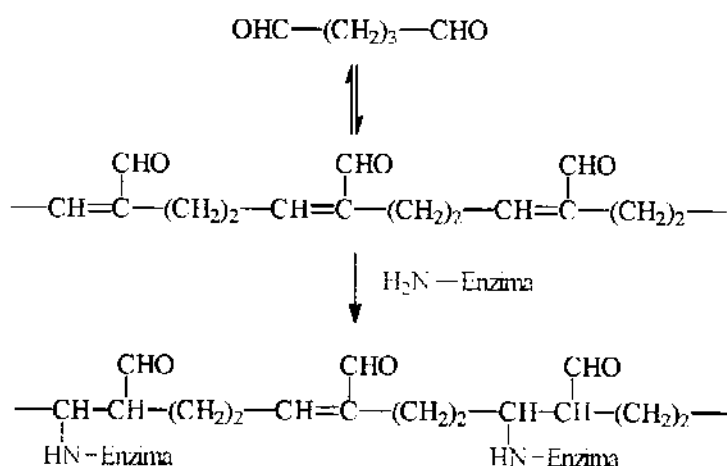


Figura 6. Método de imobilização de enzima pelo método de ligação covalente cruzada utilizando o glutaraldeído.

A eficiência da imobilização com glutaraldeído depende das condições de solução devido à multiplicidade de possíveis estruturas químicas em cada situação. Os diferentes estudos mostraram que soluções aquosas de glutaraldeído (25 ou 70 %) representam misturas de multicomponentes. O pH destas soluções é de 3,1 e pode ser explicado se alguns dos grupos aldeídicos são parcialmente oxidados aos ácidos carboxílicos correspondentes. As seguintes estruturas de glutaraldeído em solução aquosa, ácida ou neutra foram identificadas por RMN: glutaraldeído livre (a), linear mono (b) e diidratos (c), um hemiacetal cíclico (d) e oligômeros (e), como mostra a Figura 7.

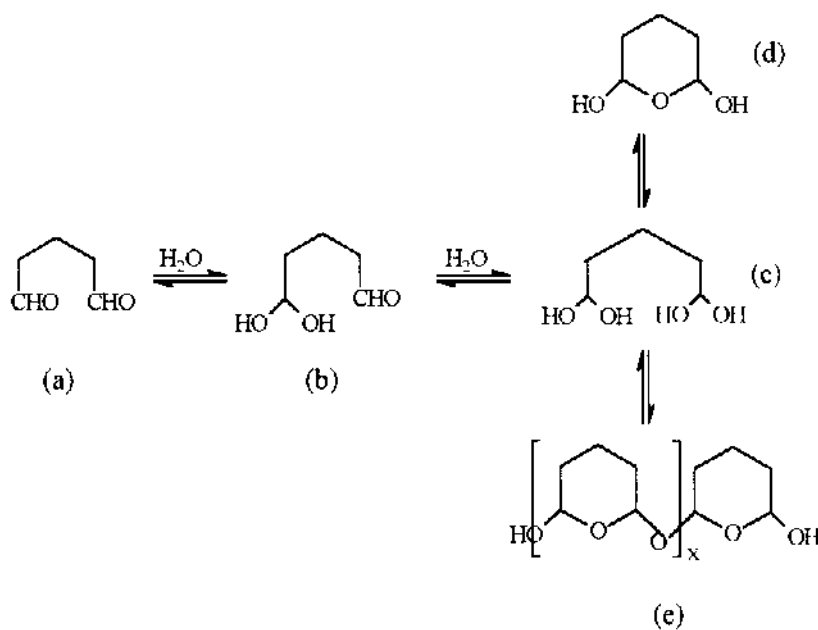


Figura 7. Estrutura do glutaraldeído em solução aquosa, ácida ou neutra (a) glutaraldeído livre, (b) linear mono, (c) diidratos, (d) hemiacetal cíclico, (e) oligômeros.

Todas estas estruturas do glutaraldeído podem reagir com proteínas por ligação covalente cruzada formando produtos com estruturas monoméricas (a) e (b) ou multiméricas (c).

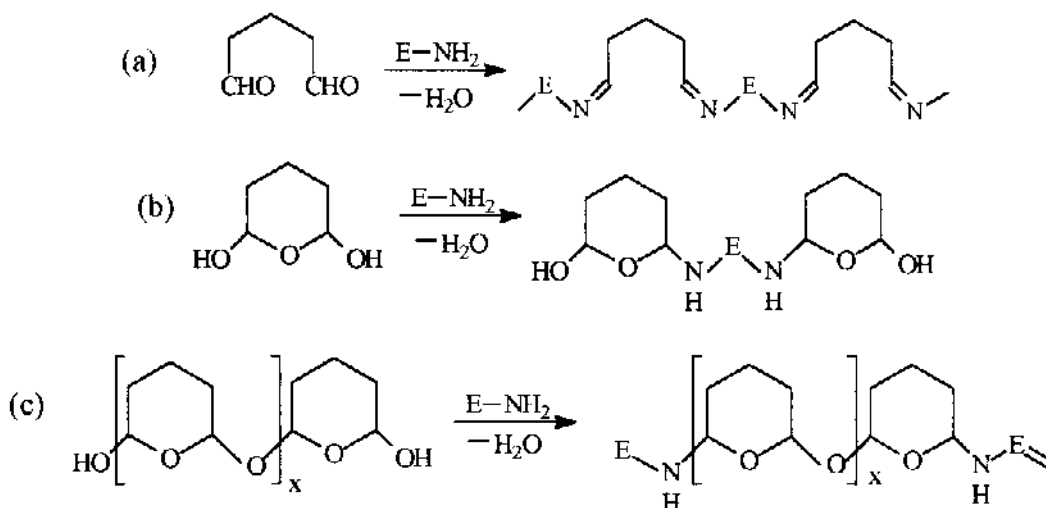


Figura 8. Reações do glutaraldeído com proteínas. (a) e (b) monoméricas, (c) multiméricas.

Sob condições básicas, glutaraldeído sofre condensação aldólica para formar aldeídos multiméricos α , β insaturados, que podem reagir com proteínas através da formação de bases de Schiff.

As estruturas do glutaraldeído em ambas as formas, linear ou cíclica, mostram melhores capacidades de imobilização em relação ao produto puro, sendo que o uso de glutaraldeído na imobilização de enzimas torna-se específico para cada proteína bem como sua aplicação (24).

A complexidade de glutaraldeído sob condições de estocagem e de reação não desencoraja seu uso na imobilização de enzimas porque todas as formas conhecidas mostram sua capacidade de reagir e ligar-se às proteínas.

A estabilidade e o tempo gasto nesta imobilização são semelhantes àqueles obtidos pelas membranas comerciais, porém, com a grande vantagem de baixo custo.

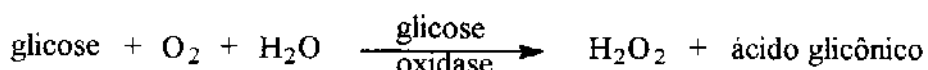
As enzimas imobilizadas podem ser utilizadas na construção de reatores (25-29) de eletrodos de pasta de carbono modificados (30-31) e de biossensores (32-35). Revisões recentes mostraram um número crescente de trabalhos nesta área (36-38).

Capítulo IV

BIOSENSORES

IV.1. Introdução

O primeiro biossensor foi desenvolvido e apresentado por Clark e Lyons no simpósio da Academia de Ciências de Nova York em 1962 (39). A enzima glicose oxidase foi imobilizada fisicamente em uma membrana de cuprofane acoplada a um eletrodo de oxigênio.



O decréscimo da pressão parcial de oxigênio está relacionado com o conteúdo de glicose presente.

Mais tarde, Updike e Hicks (40) imobilizaram esta enzima em gelatina e seus resultados foram melhorados sensivelmente. Desde então, novos biossensores têm sido projetados e utilizados em análise químicas de várias substâncias no diagnóstico clínico, indústria de alimentos e no controle ambiental (41-45). A taxa sanguínea de glicose, informação vital ao controle da diabetes é, sem dúvida, a principal aplicação atual. A detecção de peróxido de hidrogênio tornou-se, também, um caminho para a construção de biossensores baseados em enzimas oxidases imobilizadas. O peróxido de hidrogênio é uma substância importante tanto em reações biológicas quanto ambientais devido à sua capacidade de oxidar, branquear e esterilizar. Várias revisões sobre os biossensores são encontradas na literatura (38, 46-48).

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo com elemento sensor biológico intimamente ligado a um transdutor. O elemento biológico pode ser utilizado diretamente ou imobilizado em uma membrana adequada, que é acoplado junto à superfície de um transdutor, o qual irá monitorar a formação de um produto ou consumo de algum reagente.

O transdutor é um sistema capaz de transformar um tipo de sinal em outro. Neste caso, o transdutor converte o sinal biológico em sinal elétrico(49-51, 38). A Tabela 1 mostra os componentes que podem ser usados para construir um biossensor.

Tabela 1. Componentes que podem ser usados para construir um biossensor.

Elementos biológicos	Enzimas Anticorpos Antígenos Tecido animal Tecido vegetal Insetos Organelas Organismos
Transdutores	Amperométrico Condutimétrico Potenciométrico Calorimétrico Óptico Piezoelétrico

Quando o biossensor é imerso em uma solução, o substrato difunde para o interior da membrana, reage com o material biológico e formam-se os produtos desta reação. A Figura 9 ilustra o esquema geral de um biossensor.

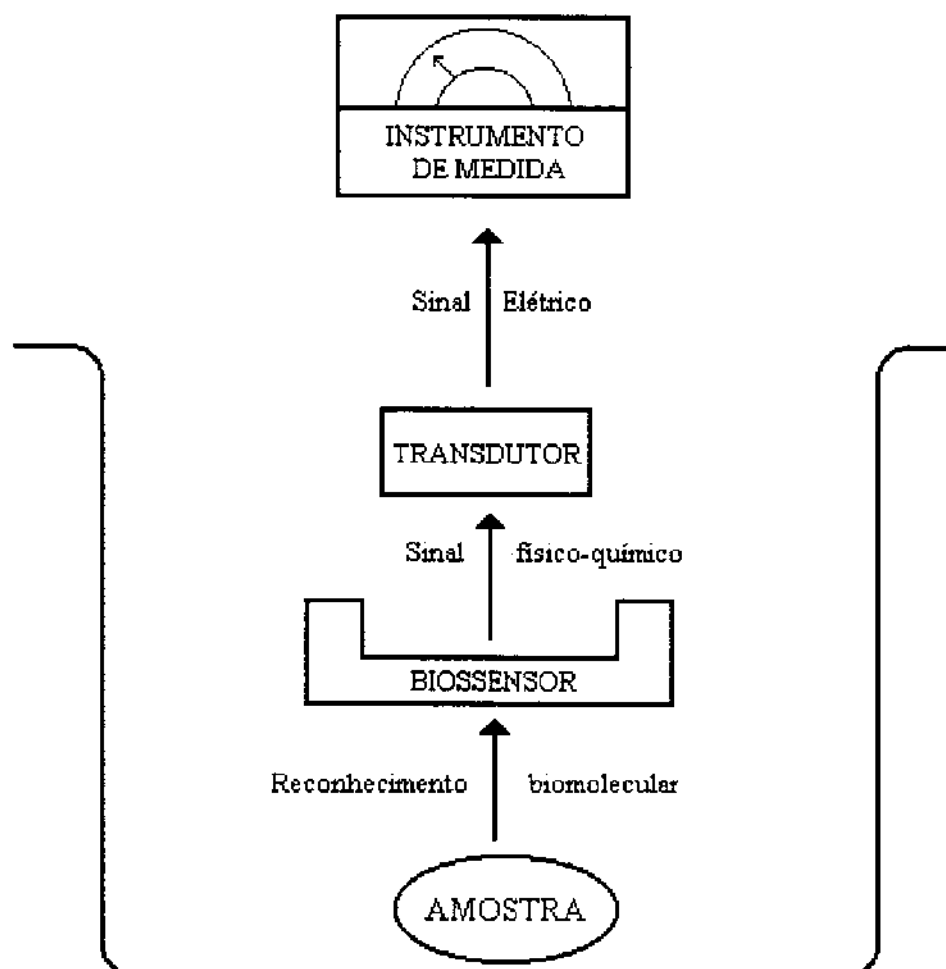


Figura 9. Esquema geral de um biossensor.

IV.2. Princípio de um biossensor

O princípio de um biossensor envolve, basicamente, quatro etapas (51-52):

IV.2.1. Escolha do elemento biológico

O primeiro passo é escolher um sistema biológico ativo que reaja seletivamente com o substrato. O ideal seria utilizar a função primária da enzima, isto é, a reação principal enzima-substrato.

IV.2.2. Imobilização do elemento biológico

A imobilização do elemento biológico consiste na sua insolubilização logo, evita a utilização de enzimas na forma solúvel. Esta imobilização não deve desnaturar o centro ativo das enzimas, devendo ser feita através de grupos que não possuam atividade catalítica.

O uso de enzimas na forma imobilizada é importante porque permite sua reutilização diminuindo, desta forma, o tempo e o custo por análise levando a uma maior reprodutibilidade.

Os tipos de imobilização são: oclusão em matriz, microencapsulação, adsorção, ligação covalente e ligação covalente cruzada, já discutidos no Capítulo III.

IV.2.3. Escolha de um transdutor adequado.

O transdutor deve detectar apenas um reagente ou produto da reação de interesse.

IV.2.4. Medida de formação do produto da reação ou do consumo de reagente.

IV.3. Característica operacional de um biossensor

Para se obter resposta de um biossensor deve haver:

- a) Transporte de substrato até a superfície do eletrodo.
- b) Difusão do substrato através da membrana até o sítio ativo da enzima.
- c) Ocorrência da reação no sítio ativo da enzima.
- d) Transporte do produto formado na reação enzimática através da membrana até a superfície do eletrodo.
- e) Medida do produto da reação enzimática.

IV.4. Desempenho analítico de um biossensor

As características mais importantes de um biossensor são: estabilidade, tempo de resposta e seletividade.

IV.4.1. Estabilidade

A definição de estabilidade é difícil porque uma enzima pode perder parte de sua atividade, resultando em um deslocamento da curva de calibração para baixo. Todavia, se o coeficiente angular permanecer constante, como frequentemente acontece, o eletrodo pode, ainda, ser utilizado, necessitando apenas de uma calibração diária.

Outro problema na definição de estabilidade é que muitos pesquisadores medem a corrente de seus eletrodos esporadicamente, após longos períodos de tempo e mostram estes dados como estabilidade. Isto pode significar que o eletrodo foi utilizado uma vez por dia ou por semana, dez ou cem vezes por dia. É evidente que, quanto maior for o uso, menor será o tempo de vida útil do eletrodo.

Os fatores que afetam a estabilidade de um biossensor são: o tipo de imobilização, quantidade e pureza da enzima, condições operacionais e estabilidade do sensor base.

a) Tipo de imobilização

O tipo de imobilização afeta consideravelmente a estabilidade de um biossensor. Um biossensor com enzima em solução é menos estável do que imobilizada fisicamente e, menos ainda do que imobilizada quimicamente.

Os biossensores com enzimas imobilizadas por métodos químicos são mais estáveis, apresentam um tempo de vida útil maior, porque as ligações entre as enzimas e os suportes são mais efetivas, reduzindo a lixiviação da camada enzimática.

b) Quantidade e pureza da enzima

A estabilidade aumenta com o aumento da camada enzimática, aumentando, também, o tempo de resposta. Muitas vezes, é vantajoso dispor de uma maior quantidade de enzima, principalmente, quando esta não for pura.

c) Condições operacionais

As condições operacionais ótimas são determinadas experimentalmente. Os fatores estudados nesta otimização são: concentração de substrato, pH, temperatura, sistema tampão e força iônica.

d) Estabilidade do sensor base

A estabilidade de um biossensor depende do sensor base utilizado.

IV.4.2. Tempo de resposta

O tempo de resposta de um biossensor pode ser afetado por fatores químicos, físicos e instrumentais. Estes fatores são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Fatores que afetam o tempo de resposta de um biossensor.

Fatores químicos	Concentração do substrato Concentração de enzima pH Ativador (Cofator) Inibidor
Fatores físicos	Temperatura Espessura da camada enzimática Velocidade de agitação da solução Espessura e permeabilidade da membrana externa.
Fator instrumental	Tempo de resposta do transdutor

IV.4.3. Seletividade

A seletividade de um biossensor é função da presença de interferentes. Portanto, o biossensor apresenta maior seletividade quanto menor for o efeito de interferentes.

As interferências em biossensores podem ser divididas em duas classes:

- a) Interferência na reação do elemento biológico com o substrato.
- b) Interferência no transdutor.

Capítulo V

BIOSENSORES BASEADOS EM TECIDOS ANIMAIS E VEGETAIS

V.1. Introdução

Do ponto de vista histórico, os biossensores baseados em tecidos foram introduzidos após o desenvolvimento de biossensores baseados em enzimas isoladas (53-55).

A estabilidade de uma enzima é, geralmente, o fator decisivo na determinação do tempo de vida de eletrodos enzimáticos. Fontes comerciais de enzimas são utilizadas, sempre que possível, porque a purificação de enzimas é tediosa e tecnicamente desafiante. Por outro lado, o custo destas enzimas torna desfavorável o seu uso.

Devido a estes fatores que limitam a utilização de eletrodos enzimáticos têm havido esforços para investigar biocatalisadores alternativos para serem utilizados na sua construção.

Uma grande variedade de fontes de tecidos animais e de plantas tem sido utilizadas, com sucesso, como componente biocatalítico na construção destes biossensores (56-57). Nestes materiais, como os componentes biológicos se mantêm no seu microambiente natural, permanecem estáveis por um tempo maior.

V.2. Mecanismo de resposta de biossensores baseados em tecidos

O mecanismo de resposta dos biossensores baseados em tecidos animais e de plantas ainda não foi determinado. Entretanto, a determinação do mecanismo de transporte envolvido é importante para o desenvolvimento destes tecidos como reagentes analíticos.

De fato, nenhum estudo fundamental a respeito dos mecanismos de transporte de moléculas de substrato e produto, dentro da camada biocatalítica da fatia de tecido é encontrado na literatura.

Vários modelos podem ser propostos para descrever a interação entre substrato e enzima na fatia de tecido (58). A Figura 10 mostra estes modelos.

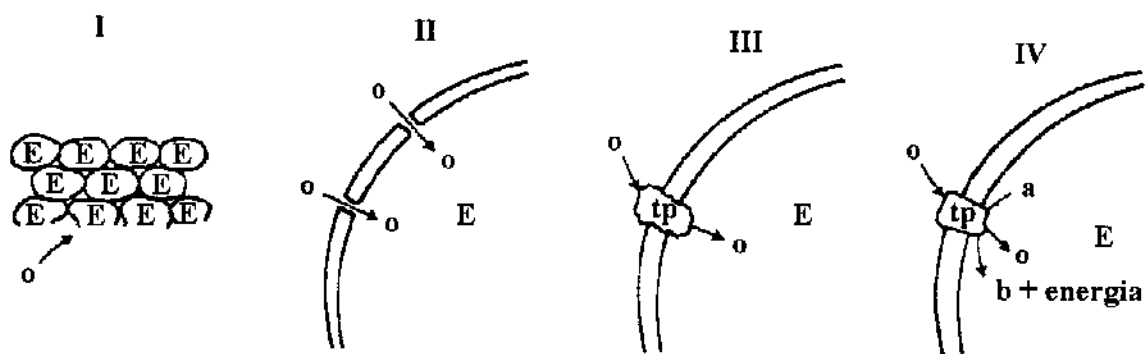


Figura 10. Representação esquemática dos modelos propostos para a interação substrato e enzima. **o**, Substrato, **E**, enzima ativa; **e**, **tp**, transporte de proteína.

O modelo I representa a situação em que as células da superfície externa da fatia de tecido completamente destruído liberam a enzima na superfície do eletrodo. Com o

envelhecimento do eletrodo ocorre a difusão de fragmentos celulares para fora da superfície do eletrodo, que expõem uma camada nova de células e, conseqüentemente produz nova remessa de enzimas. Este modelo elimina as complicações da entrada de substrato dentro das células.

A velocidade de liberação da enzima deve ser constante, consistente com a boa reprodutibilidade dos biossensores baseados em tecidos e deve ser lenta para assegurar quantidade suficiente de enzima por períodos maiores.

O modelo II representa o caso das células imobilizadas se romperem permitindo uma difusão livre de moléculas de substrato e produto dentro e fora das células do tecido, mas, não tão completamente que a enzima possa difundir fora do eletrodo. O desenvolvimento destes canais nas fatias de tecidos imobilizados pode ser devido a lavagem da camada de enzima com água ou pelo descongelamento de materiais dos tecidos previamente congelados.

Os modelos III e IV representam os casos onde as células de tecidos imobilizados permanecem intactas na superfície do eletrodo. O modelo III requer uma proteína de transporte para auxiliar no transporte deste substrato através da membrana da célula.

O modelo IV requer além desta proteína de transporte, uma fonte de energia dentro da célula de tecido para auxiliar no processo de transporte. A necessidade de uma fonte de energia torna o modelo IV pouco provável porque a viabilidade de células nestes sistemas é duvidosa.

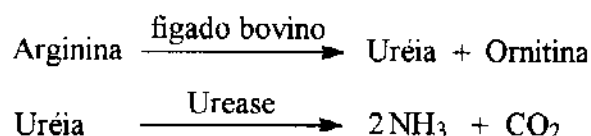
Os mecanismos de transporte tem implicações importantes com respeito a propriedades analíticas de biocatalisadores baseados em tecidos (14,58).

Durante alguns anos, os biossensores baseados em tecidos foram construídos exclusivamente utilizando-se tecidos de animais, principalmente, mamíferos talvez porque se assumia que tecidos de plantas tivessem níveis de atividade biocatalítica insuficientes para este fim (54).

As investigações sobre o uso de tecidos de plantas mostraram que estruturas especializadas de plantas como folhas, flores e raiz, bem como, suas estruturas de armazenagem de nutrientes (frutos e sementes) possuíam atividade biocatalítica altamente seletiva e, então, adequadas como biocatalisadores na construção de biossensores (59-69).

V.3. Biossensores baseados em tecidos animais

A utilização de partes intactas de tecidos animais como componente biocatalítico de um biossensor foi inicialmente apresentado com a construção de um biossensor de arginina por Rechnitz em 1978 (70). Uma fatia de fígado bovino e uma alíquota de enzima urease foram imobilizadas na superfície de um eletrodo sensível à gás amônia.



Este primeiro eletrodo baseado em fígado bovino tornou promissor o desenvolvimento de vários biossensores baseados em tecidos animais (71,72).

Mascini e col. desenvolveram eletrodos baseados em fígados de mamíferos como fonte alternativa de catalase para determinação de peróxido de hidrogênio (73). Foram obtidos bons resultados e a facilidade de construção do eletrodo baseado em fígado de boi permitiu uma avaliação detalhada do desempenho deste eletrodo. Fígado contém uma grande quantidade de catalase que catalisa a reação:



Uma fatia do fígado de boi (espessura 0,1 mm) foi acoplada a um eletrodo de oxigênio. As medidas da corrente foram feitas em solução tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹, pH 6,8 à 25 °C. Este eletrodo mostrou ser menos sensível a variações de pH, natureza do tampão e temperatura que o eletrodo enzimático (comercial). Isto talvez porque a catalase seja protegida pelos constituintes do tecido contra variações externas.

O eletrodo baseado em fígado de boi mostrou ser comparável em relação a sensibilidade, tempo de resposta e superior em termos de estabilidade e tempo de vida do que o eletrodo baseado em catalase comercial (E. C. 1.11.1.6) descrito por Aizawa e col.(74).

V.4. Biossensores baseados em tecidos de plantas

V.4.1. Biossensores baseados em flores

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

Pétalas de flores de magnólia (*Magnolia grandiflora*) foram utilizadas para a construção de um biossensor baseado em flores para determinação de L-glutamina e L-asparagina (75). Estas pétalas foram fatiadas longitudinalmente para remover a casca hidrofóbica externa e, em seguida, preparou-se discos de 12 mm e com 0,1 - 0,4 mm de espessura. Cada disco foi mantido diretamente na superfície de um eletrodo sensível a gás amônia. Nenhuma membrana de suporte foi utilizada neste arranjo.

A principal vantagem da utilização de fatias de tecidos intactos de pétalas de flores foi uma redução significativa do tempo de resposta devido a eliminação da membrana de suporte na construção do biossensor. O biossensor baseado em fatia de pétala de flor de magnólia apresentou tempo de resposta de 3 minutos a nível de mmoles.L^{-1} com espessura de tecido de 0,1 mm. Os biossensores baseados em tecidos de plantas (54, 76) apresentaram tempo de resposta na faixa de 10 a 20 minutos, com resposta sendo determinada por passos difusionais através da estrutura tipo sanduíche da camada biocatalítica e suas membranas de suporte.

V.4.2. Biossensores baseados em folhas

Folhas de plantas apresentam um arranjo estrutural natural atraente para serem utilizadas como membranas biocatalíticas em biossensores.

As folhas possuem uma estrutura de multicamadas que consiste de uma camada de cera (cutícula) na superfície externa, uma camada de células epidérmicas, seguida de uma terceira camada, o mesófilo esponjoso, diretamente abaixo da epiderme. Este mesmo arranjo se repete do outro lado da folha.

As cutículas são hidrofóbicas por natureza, mas, permitem a passagem de gases. A troca de gases ocorre através de pequenas aberturas na superfície conhecida como estômatos. A remoção da cutícula antes da fixação da folha permite o substrato difundir dentro do mesófilo esponjoso. A camada do mesófilo esponjoso é a mais ativa nos processos metabólicos envolvendo gases.

Um biossensor baseado em folhas de pepino (*Cucumis sativus*, C. V. Burpee Hybrid) que possui atividade de L-cisteína dissulfidrase foi proposto para determinação de L-cisteína por Smit e Rechnitz (76). A cutícula da folha de pepino foi removida mecanicamente da camada de epiderme superior ou inferior e fixa na superfície de um eletrodo sensível a gás amônia com a camada do mesófilo esponjoso em contato com a amostra.

V.4.3. Biossensores baseados em raízes

Tecido de beterraba (*Beta vulgaris altissima*), que contém atividade da enzima tirosinase, foi proposto como biocatalisador na determinação de tirosina por Schubert e colaboradores (77). Fatias com espessura de 100 μm foram cortadas da parte interna da beterraba. Esta fatia foi acoplada na ponta de um eletrodo de oxigênio com uma membrana de diálise e presa por um anel de borracha.

O eletrodo baseado em tecido de beterraba foi estável a temperatura ambiente e não apresentou larga faixa de pH de 5,0 a 8,0. O tempo de resposta variou entre 5 e 10 minutos dependendo do tempo de operação do eletrodo. A faixa de concentração de tirosina determinada pelo biossensor proposto foi de 0,03 a 0,9 mmol.L⁻¹. O tempo de vida deste biossensor foi de 8 dias.

V.4.4. Biossensores baseados em sementes

O uso de sementes de alface, como fonte de catalase, foi proposto para determinação de peróxido de hidrogênio por Fang e colaboradores (78). 10 mg de semente de alface em pó foram espalhadas sobre uma membrana de teflon e cobertas com uma membrana de acetato de celulose. Esta membrana biocatalítica foi acoplada a um eletrodo de oxigênio e fixa por um anel de borracha.

O biossensor baseado em semente de alface apresentou um tempo de resposta de 2 minutos, com boa reprodutibilidade e estabilidade e, ainda, pode ser estocado a temperatura ambiente.

V.4.5. Biossensores baseados em frutas

O uso do tecido de uva Thompson (*Vitis vinifera*) como fonte de catalase foi proposto para a determinação de peróxido hidrogênio por Wijesuriya e colaboradores (79). Uma fatia do tecido de uva com espessura de 0,5 mm foi acoplado a um eletrodo de oxigênio por uma rede de nylon e um anel de borracha. O tempo de resposta foi de 1 minuto, que é comparável aos eletrodos baseados em enzimas para determinação de peróxido de hidrogênio já citados (73, 74). O eletrodo baseado em tecido de uva mostrou excelente estabilidade à variações de pH (5,5 a 8,5) que é melhor do que dos eletrodos

enzimáticos de catalase (E. C. 1.11.1.6) (73, 80). A resposta deste eletrodo foi linear por mais de uma década de concentração de peróxido de hidrogênio.

O tempo de vida do eletrodo baseado em tecido de uva foi melhor do que o eletrodo baseado em tecido animal e o de catalase comercial imobilizada para determinação de peróxido de hidrogênio (73, 74).

Capítulo VI

CONSTRUÇÃO DE UM BIOSSENSOR BASEADO NO EXTRATO ENZIMÁTICO DE BESOUROS BOMBARDEIROS *(Pheropsophus aequinoctialis)*

VI.1. Introdução

VI.1.1. Besouros bombardeiros

A ordem dos coleópteros compreende os insetos conhecidos por besouros que se distinguem facilmente pela presença dos élitros. São insetos de tamanho bastante variado, desde minúsculos insetos de frações de milímetro, até os de porte maior, atingindo 200 mm de corpo.

A teoria da evolução argumenta que as espécies animais evitam ser capturadas por predadores. Como nem sempre a fuga é possível, a vítima deve ter uma variedade de opções de defesa disponíveis. De fato, os artrópodes apresentam uma diversidade rica de sistemas de defesa.

Os compostos de defesa dos artrópodes são derivados de fontes glandulares e não glandulares. Estas fontes podem ser convenientemente classificadas pela sua localização no corpo e pela sua morfologia funcional global. Para metade da ordem de artrópodes, a forma mais comum de defesa ao ataque predatório é a defesa química, sendo a de origem glandular, uma defesa que é particularmente bem desenvolvida nos coleópteros (81, 82).

As análises dos arsenais de defesa química destes artrópodes tem mostrado que eles podem ser considerados químicos de produtos naturais por excelência. O grande número de compostos identificados na secreção defensiva destes animais enfatiza que a exocrinologia dos insetos é um campo altamente distinto da bioquímica. Embora a biossíntese de muitos destes produtos não tenha sido elucidada, a presença de compostos tão diversos quanto alcalóides e sulfeto de alquila, sugere que muitos novos caminhos metabólicos destes invertebrados sejam acompanhados por especializações morfológicas que garantem que os compostos potencialmente tóxicos gerados estejam isolados dos tecidos sensíveis destes insetos. Esta combinação de idiosincrasias biossintéticas e morfológicas é uma

insetos. Esta combinação de idiosincrasias biossintéticas e morfológicas é uma característica da defesa química de insetos.

Um dos mecanismos de defesa mais notáveis dos artrópodes é apresentado pelos besouros bombardeiros (Ordem dos Coleópteros, Família dos Carabídeos, Gêneros *Brachinus*, *Metrius*, *Pheropsophus*, *Ozaena*, *Phatycerozaena*, *Goniotropis*, *Physia*, *Homopterus*).

Os besouros bombardeiros são, geralmente, encontrados no solo e se mostram mais ativos durante a noite ou ao crepúsculo.

A sua forma de defesa é peculiar porque enquanto a grande maioria dos insetos armazena o material repelente na forma de produto acabado, nos besouros bombardeiros os substratos são convertidos nos produtos ativos no momento do ataque predatório.

No Brasil foram encontrados, o *Pachyteles*, no Mato Grosso e o *Pheropsophus*, em Santarém, no Estado do Pará, onde vivem em solos arenosos adjacentes a capinzais e em Areia, no Estado da Paraíba e em São Paulo de Potengi no Estado do Rio Grande do Norte nas proximidades de açudes ou de pequenos riachos. Cabe acrescentar a esses gêneros, os demais citados anteriormente que estão, também, presentes em nosso território.

Na Europa, foram encontrados as espécies *Brachinus explodens* e *Brachinus crepitans* nas pedras das regiões montanhosas da França e da Francônia, na Alemanha (83-86).

O sistema de defesa dos besouros bombardeiros é formado por um par de estruturas que ocupa porção considerável de seu abdômen. Cada uma delas comporta um reservatório que contém uma solução aquosa de hidroquinona e água oxigenada. Os reagentes estão presentes no reservatório em concentrações elevadas: hidroquinona a 10 % e água oxigenada a 25 %. Estes reservatórios são transparentes e envoltos por uma fina camada muscular. Internamente, por razões de natureza estrutural, são compartimentados com

tecido quitinoso, um tecido rígido que forma uma espécie de exoesqueleto nestes artrópodes

Sob o controle de um músculo altamente especializado, o conteúdo destes reservatórios é comprimido em direção a uma câmara de reação situada um pouco abaixo, onde é transformado pela ação das enzimas catalase e peroxidase, secretadas por tecidos adjacentes. O músculo que regula o acesso de substrato à câmara de reação é controlador efetivo da extensão da reação e, ainda, permite ao inseto borrifar vários jatos seguidos, bem como, pulsar cada um em seqüências muito rápidas (85, 87-90).

Uma representação esquemática do sistema de defesa de um besouro bombardeiro é mostrada na Figura 11.

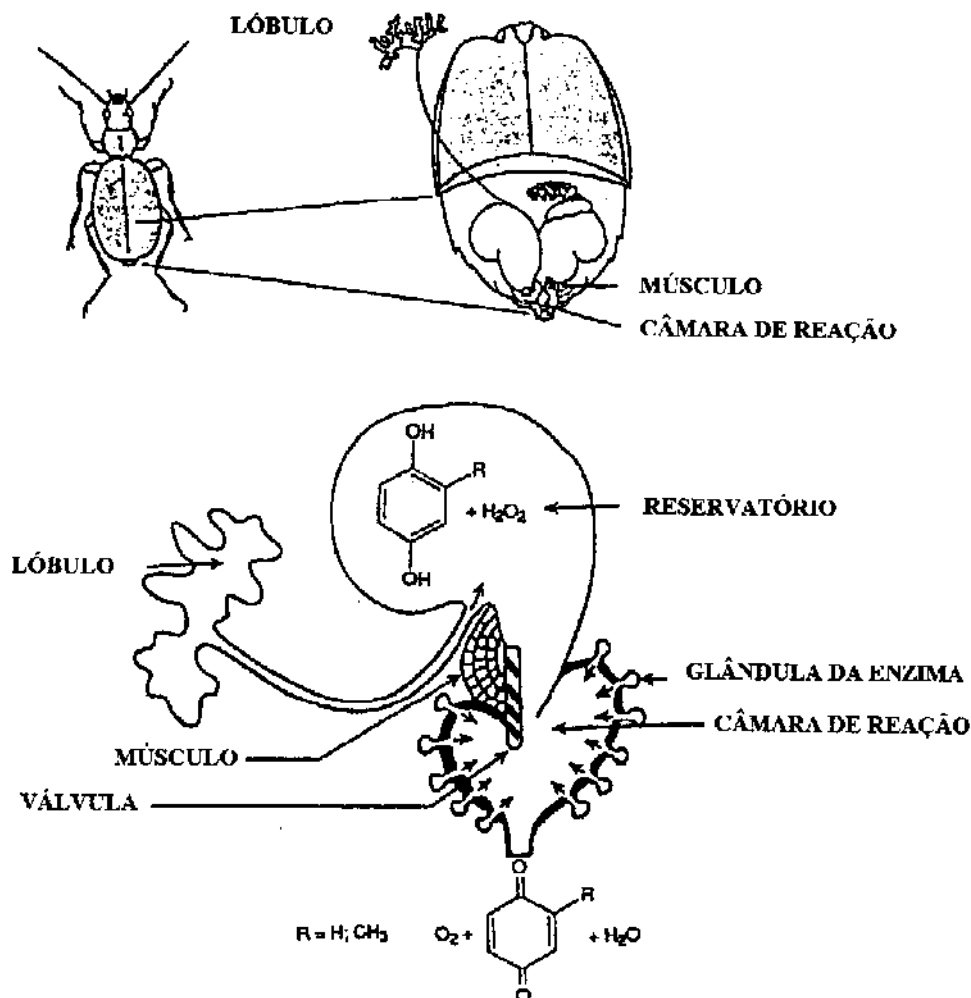


Figura 11. Representação esquemática do sistema de defesa de um besouro bombardeiro.

Na câmara de reação, a catalase decompõe a água oxigenada em água e oxigênio, enquanto que, a peroxidase catalisa a reação de oxidação que transforma hidroquinona na quinona correspondente. A Figura 12 mostra as reações do sistema de defesa dos besouros bombardeiros e os respectivos catalisadores.

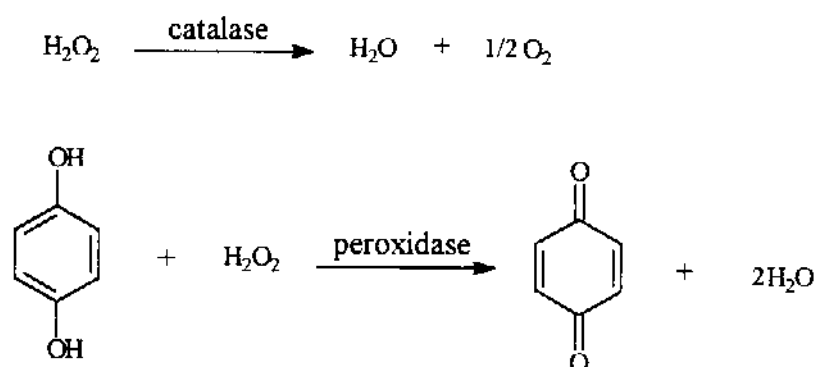


Figura 12. Reações do sistema de defesa dos besouros bombardeiros e os respectivos catalisadores.

Os produtos da reação são expelidos por um par de dutos revestidos de quitina sob pressão de oxigênio e do vapor d'água. A formação de quinonas é acompanhada pela liberação de calor e o jato é lançado a uma temperatura espantosamente alta de 100 °C. Este jato é um dissuasivo efetivo a predadores, visível como uma névoa fina, e acompanhado de uma explosão audível da qual originou o nome de besouros bombardeiros. Estes besouros apontam seu jato com precisão na direção do inimigo através da rotação da extremidade de seu abdômen, atingindo um arco equivalente a meio hemisfério (91-94).

A Figura 13, ilustra o disparo do jato dos besouros bombardeiros.



Figura 13. Disparo do jato de um besouro bombardeiro.

As reações catalisadas na câmara de reação são fortemente exotérmicas, sendo que a reação de decomposição da água oxigenada pela catalase produz 49.000 calorias por mol e a reação de oxidação catalisada pela peroxidase produz 23.500 calorias por mol. O conteúdo de calor do material lançado é estimado em 0,2 calorias por miligrama de solução. Esta quantidade de calor liberada é suficiente para que o material seja lançado a temperaturas próximas de 100 °C, bem como, para vaporizar 30 % da água de maneira que, parte das quinonas é obtida em estado gasoso (85, 92).

Os besouros bombardeiros podem ser criados em cativeiro com relativa facilidade. O besouro *Pheropsophus aequinoctialis*, presente na América Central e do Sul, é uma espécie maior do que as européias e as norte americanas, tem 2,5 cm de comprimento. Estes besouros foram alojados em caixas forradas com uma camada de terra arenosa e alimentados com flocos de aveia e pedaços da larva de *Tenebrio Molitor* ou de mosca doméstica. A criação destes besouros pelo Prof. Klaus Zinner, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP), possibilitou o desenvolvimento de um biossensor.

VI.1.2. Objetivo

O objetivo deste trabalho consiste na construção de um biossensor baseado no extrato enzimático dos besouros bombardeiros (*Pheropsophus aequinoctialis*) para determinação de peróxido de hidrogênio. A imobilização das enzimas catalase e peroxidase presentes no jato lançado pelos besouros é feita em uma membrana de colágeno utilizando-se o glutaraldeído para formação da ligação covalente cruzada.

VI.2. Parte experimental

VI.2.1 Aparelhagem

O eletrodo de oxigênio tipo Clark utilizado (Tipo OP 9343-S, Radelkis) consiste de um cátodo de platina, de 20 μm de diâmetro, um ânodo de prata-cloreto de prata e o eletrólito de preenchimento é uma solução tampão contendo íons cloreto.

A membrana sensível à gás utilizada foi de teflon (espessura 12 μm , Radelkis).

Este conjunto é acoplado a um aparelho para determinação de pO_2 - pCO_2 (Tipo OP 925-2, Radelkis) para medidas da pressão parcial de oxigênio, em mmHg. Estas medidas foram feitas em uma célula termostaticada por um banho (Modelo Q 214-2, Quimis) com agitação (Modelo PC 351, Corning).

VI.2.2. Imobilização das enzimas

O extrato enzimático foi obtido apertando-se o abdômen dos besouros bombardeiros, criados em cativeiros pelo Prof. Klaus Zinner (USP/SP).

A imobilização do extrato enzimático do besouro bombardeiro, contendo as enzimas catalase e peroxidase, foi feita em uma membrana de colágeno (4 x 1 cm e espessura 0,02 mm) fornecida pela Johnson & Johnson.

Nesta membrana de colágeno colocou-se 100 μL do extrato enzimático, juntou-se 20 μL de soroalbumina bovina 17,5 % em solução tampão fosfato 0,1 mol.L^{-1} , pH 7,0 e misturou-se com um bastão fino. Em seguida, juntou-se 20 μL de glutaraldeído 25 % e, misturou-se novamente. Deixou-se em dessecador por 30 minutos e, depois guardou-se em refrigerador, por uma noite.

No dia seguinte, lavou-se a membrana com solução de glicina $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ para retirar o excesso de glutaraldeído e, acoplou-se ao eletrodo de oxigênio. Este biossensor foi guardado no refrigerador quando não em uso.

VI.2.3. Construção do biossensor

O biossensor foi construído acoplado lateralmente a membrana de colágeno, contendo as enzimas imobilizadas, a um eletrodo de oxigênio. Esta membrana biocatalítica foi presa ao eletrodo através de uma rede de nylon e um anel de borracha, como mostra a Figura 14.

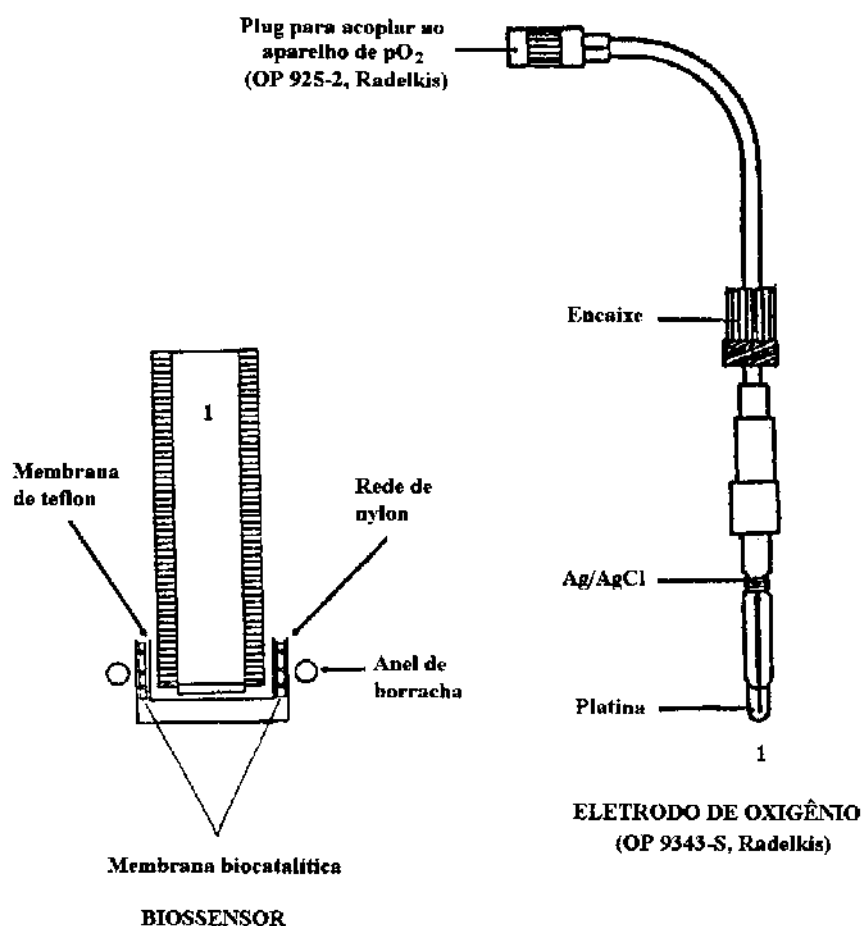


Figura 14. Construção do biossensor baseado no extrato enzimático de besouros bombardeiros.

VI.2.4. Procedimento

As medidas amperométricas foram feitas mergulhando-se o biossensor em uma célula de vidro com tampa contendo 5,0 mL de solução fosfato $1/15 \text{ mol. L}^{-1}$, pH 5,5.

A célula de medida foi termostaticada à $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e a solução tampão fosfato desaerada com nitrogênio. Em seguida, juntou-se $50 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de peróxido de hidrogênio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e mediu-se a variação de pressão parcial de oxigênio após 10 minutos. Estas medidas foram realizadas sob agitação magnética constante.

A solução de peróxido de hidrogênio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ foi preparada à partir de uma solução de H_2O_2 30 %. Esta solução foi padronizada com solução padrão de permanganato de potássio por titulação.

VI.3. Resultados e Discussão

A fim de se obter o melhor desempenho do biossensor baseado no extrato enzimático de besouros bombardeiros foram estudados os seguintes parâmetros:

VI.3.1. Efeito da quantidade de extrato enzimático imobilizado

A Figura 15 mostra o efeito da quantidade de extrato enzimático imobilizado na membrana de colágeno sobre a resposta do biossensor construído. De acordo com esta Figura, a resposta deste biossensor é dependente da quantidade de extrato enzimático imobilizado.

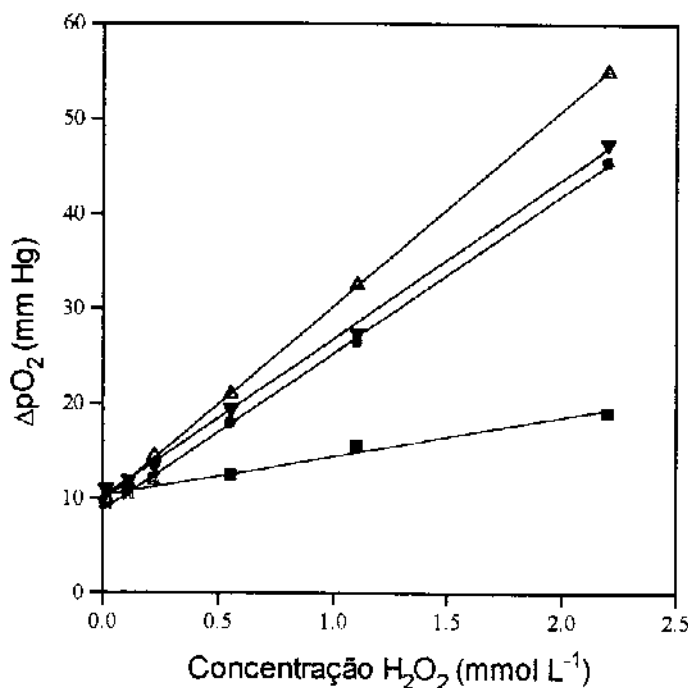


Figura 15: Efeito da quantidade de extrato enzimático imobilizado em membrana de colágeno. ■ 50 μL; ● 100 μL; ▲ 150 μL; ▼ 200 μL.

A variação da pressão parcial de oxigênio para um volume de 50 μL de extrato enzimático imobilizado foi pequena quando comparada com os volumes de 100, 150 e 200

μL . A sensibilidade foi aumentada por uma década de concentração, porém, a imobilização de volumes maiores é dificultada devido à estreita membrana utilizada.

A imobilização de 100 μL de extrato enzimático em membrana de colágeno utilizando o glutaraldeído foi adotado para a realização dos estudos para o biossensor construído.

VI.3.2. Efeito do pH

A Figura 16 mostra a influência do pH sobre a resposta do biossensor baseado no extrato dos besouros bombardeiros. A faixa de pH estudada foi de 4,0 a 7,9, preparada à partir de soluções de fosfato de sódio e de fosfato de potássio $1/15 \text{ mol.L}^{-1}$.

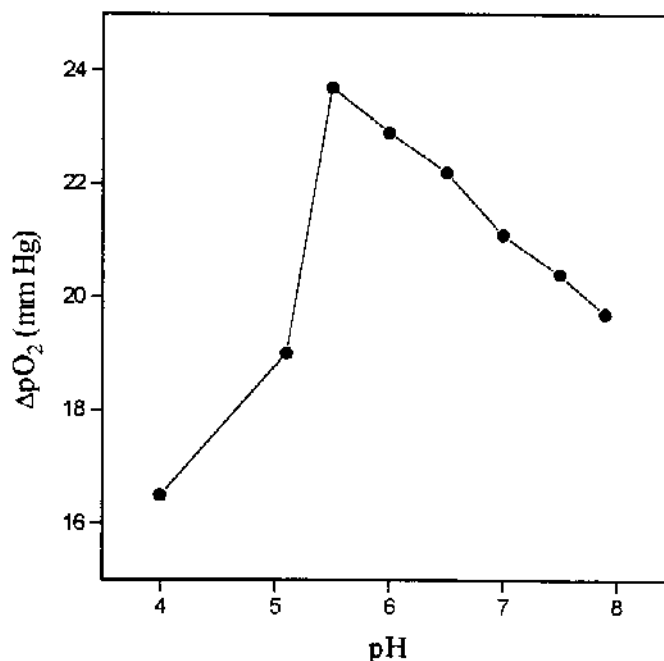


Figura 16. Efeito de pH sobre a resposta do biossensor. Temperatura: $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$. $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

As soluções fosfato $1/15 \text{ mol.L}^{-1}$ nos respectivos pHs foram termostatizadas à $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$. A concentração de peróxido de hidrogênio presente foi de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

Como pode ser observado nesta Figura 16, a resposta máxima deste biossensor foi obtida em pH 5,5. Conseqüentemente, todos os estudos foram realizados neste pH.

VI.3.3. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre a resposta do biossensor proposto foi estudado variando-se de 15,0 a 32,0 °C, como mostra a Figura 17.

A célula contendo 5,0 mL de solução tampão fosfato $1/15 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5,5 foi termostaticada na temperatura em estudo e, desaerada com nitrogênio. A concentração de peróxido de hidrogênio presente foi $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

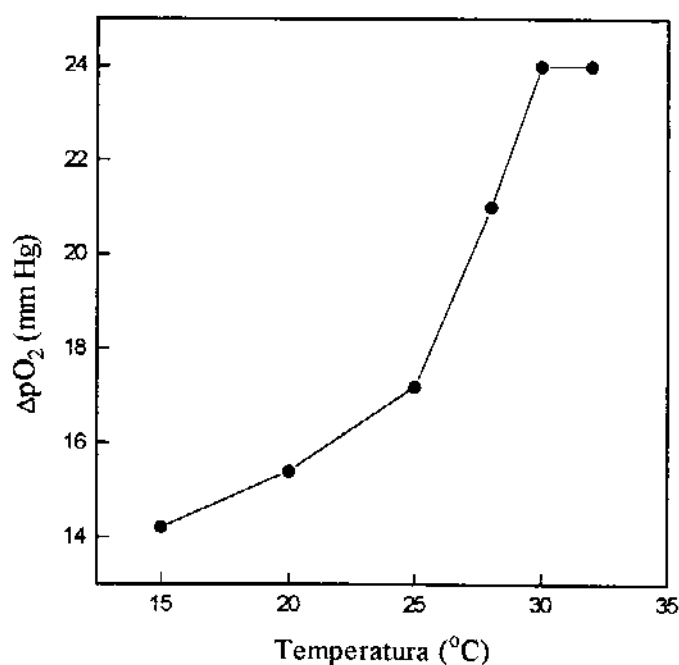


Figura 17. Efeito da Temperatura sobre a resposta do biossensor. $[H_2O_2] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e solução tampão fosfato $1/15 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5.5.

A resposta máxima deste biossensor foi obtida nas temperaturas de 30,0 e 32,0 °C, sendo que a atividade enzimática é reduzida para temperaturas inferiores.

Apesar da possibilidade de se utilizar estas enzimas à temperaturas muito altas (85, 91), há uma limitação do eletrodo de oxigênio que acima de 34,0 °C leva a formação de

vapor d'água. De fato, as medidas da variação da pressão parcial de oxigênio realizadas com o biossensor baseado no extrato enzimático de besouros bombardeiros em célula termostaticada à 34,0 °C, não apresentaram respostas reprodutíveis.

VI.3.4. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio

A curva de calibração de peróxido de hidrogênio, pressão parcial de oxigênio em relação a concentração de H_2O_2 , está apresentada na Figura 18.

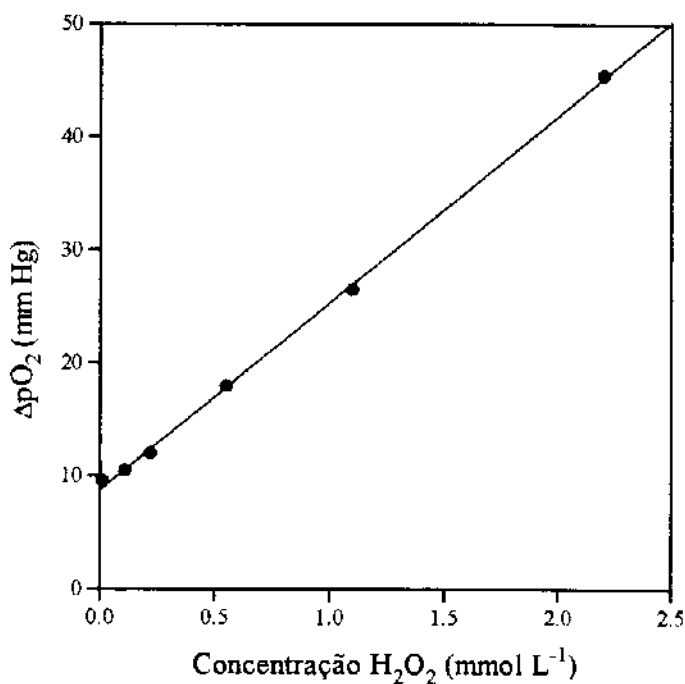


Figura 18. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio. Solução tampão fosfato 1/15 mol.L^{-1} ; pH 5,5; Temperatura, 30,0 °C.

Estes resultados foram obtidos utilizando-se uma célula termostaticada à 30,0 °C, contendo 5,0 mL de solução tampão fosfato 1/15 mol.L^{-1} , pH 5,5. Após a desaeração do oxigênio dissolvido nesta solução, adicionou-se solução de peróxido de hidrogênio. As leituras da variação da pressão parcial de oxigênio foram realizadas após 10 minutos.

A membrana biocatalítica continha 100 μL de extrato enzimático imobilizado em membrana de colágeno.

A resposta do biossensor baseado no líquido ejetado pelos besouros bombardeiros foi linear na faixa de $2,0 \times 10^{-4}$ a $2,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de H₂O₂ e pode ser descrita pela equação:

$$y = 16,6 (\pm 0,2) x + 8,7 (\pm 0,3) \quad r = 0,9996$$

onde y é a variação da pressão parcial de oxigênio em mmHg e x é a concentração de peróxido de hidrogênio em mol.L⁻¹.

A estimativa do desvio padrão relativo para 6 medidas a $1,1 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de H₂O₂ foi de 2,0 %.

VI.3.5. Determinação da constante de Michaelis-Menten aparente

A constante de Michaelis-Menten (K_m) para enzimas imobilizadas é denominada de constante de Michaelis-Menten aparente (K_m'). Esta constante indica a afinidade relativa de substratos para uma determinada enzima. A Figura 19 mostra a determinação de K_m' para o biossensor baseado no extrato enzimático dos besouros bombardeiros. O valor do K_m' obtido é $1,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ e, pode ser descrita pela equação:

$$y = 22,8(\pm 1,5)x + 19,4(\pm 2,0) \quad r = 0,9977$$

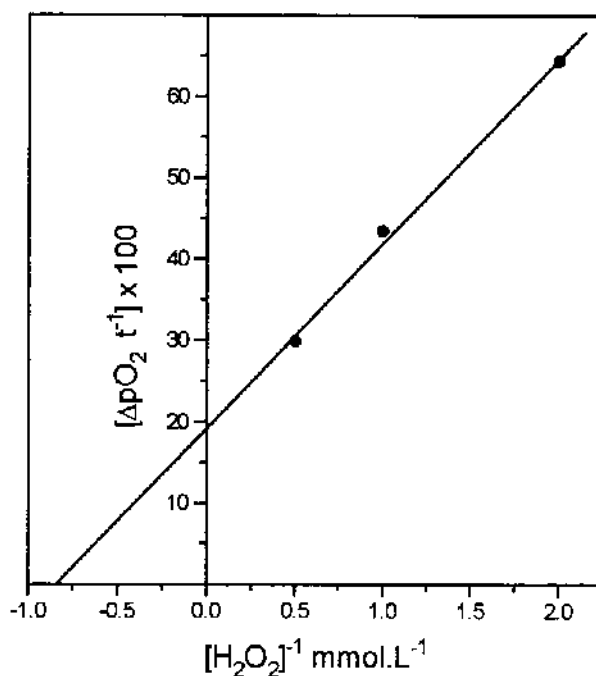


Figura 19. Determinação de K_m' para o biossensor baseado no extrato enzimático dos besouros bombardeiros

VI.3.6. Efeito de interferentes

O estudo da interferência de hidroquinona, catecol e dopamina sobre a resposta do biossensor baseado na imobilização do extrato de besouro bombardeiro é apresentado na Figura 20. Na reação de oxidação destes interferentes com peróxido de hidrogênio catalisada pela peroxidase ocorre um decréscimo na ΔpO_2 , enquanto que, na reação de peróxido de hidrogênio catalisada pela catalase, há formação de pressão parcial de oxigênio. A hidroquinona mostrou um efeito maior como esperado, já que a hidroquinona é substrato de peroxidase presente na fonte utilizada.

Os testes realizados com este biossensor na presença de cobre, ferro, manganês, mercúrio, sulfito, cianeto, fluoreto, entre outros, não apresentaram interferência nesta determinação.

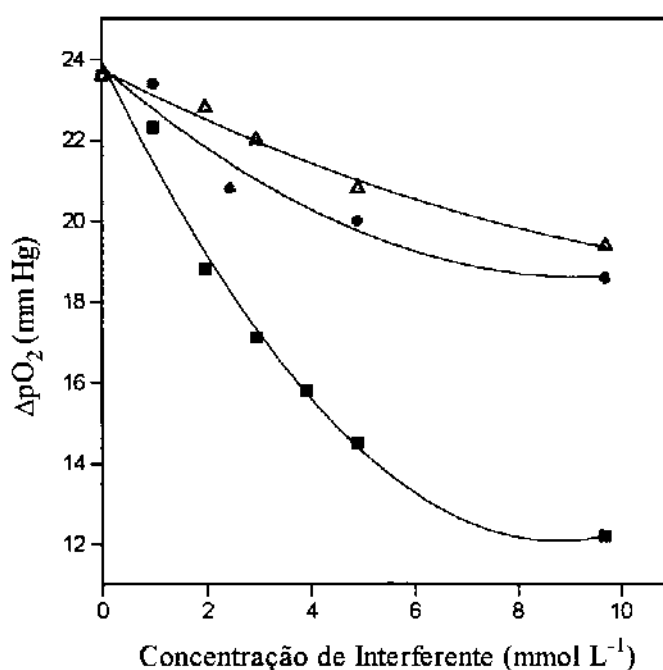


Figura 20: Efeito de interferentes sobre a resposta do biossensor. Temperatura: 30 °C.

■Hidroquinona; ●Catecol; ▲Dopamina

VI.3.7. Efeito de envelhecimento do extrato enzimático

Em geral, as enzimas requerem cuidados na sua conservação. Para checar a atividade enzimática foi utilizado um extrato enzimático guardado em um freezer durante oito meses.

A imobilização de 100 mL deste extrato foi feita em esponja de colágeno. Juntou-se 20 mL de solução de soroalbumina bovina 17,5 % em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0. Misturou-se com bastão fino. Em seguida, juntou-se 20 mL de glutaraldeído 25 % e, misturou-se novamente. Deixou-se em dessecador por 30 minutos e, depois foi guardado em refrigerador por uma noite.

No dia seguinte, lavou-se a membrana com solução de glicina $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ para remover o excesso de glutaraldeído. Esta membrana biocatalítica foi acoplada ao eletrodo de oxigênio.

O mesmo procedimento de imobilização foi utilizado para obter uma membrana com extrato enzimático novo.

As medidas da variação da pressão parcial de oxigênio foram feitas em uma célula contendo 5,0 mL de solução tampão fosfato $1/15 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5,5, desaerada com nitrogênio e, termostaticada à $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ em um banho. Adicionou-se 50 mL de solução de peróxido de hidrogênio $0,1122 \text{ mol.L}^{-1}$.

Os resultados obtidos para cada biossensor em função do tempo estão apresentados na Tabela 3. Pelos dados desta Tabela, pode-se concluir que não há diferença significativa entre os dois biossensores propostos, permitindo o armazenamento do extrato enzimático pelo menos até oito meses.

Tabela 3: Efeito do envelhecimento do extrato enzimático do besouro bombardeiro. $[H_2O_2] = 1,1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Temperatura, 30,0 °C.

Tempo (min)	ΔpO_2 (mm Hg)	
	Extrato Novo	Extrato Velho ^a
1	10,5	10,5
2	18,5	17,5
3	25	23,5
4	29	27
5	32,5	30
6	35	34
7	36,5	36
8	37,5	38
9	38,5	39,5
10	40,5	41
11	41	42,5
12	42	43,5
13	42,5	44
14	43	44,5
15	43,5	45

a: 8 meses

VI.4. Conclusão

O jato lançado pelos besouros bombardeiros (*Pheropsophus aequinoctialis*) na defesa contra predadores possibilitou a construção de um biossensor amperométrico para determinação de peróxido de hidrogênio

A imobilização do extrato enzimático com glutaraldeído mostrou-se bastante adequada, considerando-se que foi utilizado material enzimático sem qualquer purificação.

O biossensor baseado no extrato enzimático dos besouros bombardeiros apresentou resposta linear na faixa de concentração de $2,0 \times 10^{-4}$ - $2,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio. Esta faixa linear é superior àquela obtida por Aizawa e colaboradores (74) que empregaram catalase comercial. O biossensor proposto demonstrou boa seletividade, comparável com aqueles descritos na literatura, que empregam enzimas purificadas ou fontes alternativas (73, 80). O tempo de resposta foi de dez minutos e foi possível realizar cinquenta análises sem perda de atividade.

Um dos fatores limitantes no manuseio de enzimas é a temperatura. Geralmente, as enzimas sofrem desnaturação a temperaturas elevadas. É importante salientar que as enzimas, catalase e peroxidase, presentes no jato lançado pelos besouros bombardeiros resistem à temperaturas bastante altas (cerca de 100 °C). Neste caso, a limitação está no eletrodo de oxigênio pela formação de vapor d'água a temperaturas acima de 34,0 °C. Este fato poderá ensejar a utilização destas enzimas em análises por outras metodologias, com o espectrofotometria, que permite trabalhar em temperaturas mais elevadas.

Outro aspecto relevante é a possibilidade de utilização deste biossensor sem a necessidade do emprego de conservantes, indispensável no caso de alguns trabalhos encontrados na literatura (73).

Finalmente, vale ressaltar que este biossensor parece ser o primeiro baseado em materiais de insetos.

Capítulo VII

CONSTRUÇÃO DE UM BIOSSENSOR BASEADO NO TECIDO DE PINHÃO

(Araucaria angustifolia)

VII.1. Introdução

VII.1.1 Pinheiros do Paraná

As coníferas constituem a maior e a mais significativa classe de gimnospermas. Neste grupo incluem-se a mais alta das plantas vasculares, a *Sequoia sempervirens*, encontrada na costa da Califórnia com até 117 metros de altura e diâmetro maior que 11 metros e, também, os pinheiros.

A distribuição geográfica das coníferas é muito vasta. Em muitas regiões, formam matas contínuas, de grande importância econômica, dando aspecto característico à região. Geralmente, habitam as zonas temperadas e na zona tropical são limitadas ao alto das montanhas.

O hemisfério norte é mais rico em espécies do que o sul. É interessante notar que a América do Norte e a Europa não possuem espécies nativas em comum. As pináceas são exclusivas do Norte e as araucariáceas do Sul. Podocarpáceas e taxodiáceas são encontradas em ambos os hemisférios. Muitas espécies tem valor ornamental e silvicultural tão grande que estão sendo plantadas em grande escala.

A família das Araucariáceas é composta de dois gêneros, a *Araucaria* e a *Agathis*. A *Araucaria* tem duas espécies na América do Sul e duas na Austrália ().

- a) *Araucaria angustifolia* - também conhecida como *Araucaria brasiliensis*, ocorre no Sul do Brasil e na Argentina.
- b) *Araucaria araucana* - também conhecida como *Araucaria do Chile*, ocorre no Sul do Chile e na Argentina.

- c) *Araucaria excelsa* - também conhecida como Araucaria da Ilha de Norfolk, encontrada na Austrália. As folhas desta Araucaria são estreitas e menos pontiagudas e duras que as do pinheiro brasileiro.
- d) *Araucaria bidwillii* - também conhecida como Araucaria da Austrália. Apresenta contornos perfeitamente piramidais e suas folhas são semelhantes com as do pinheiro brasileiro.

O outro gênero, *Agathis* (*Damara*) é, também, nativa da Austrália. Caracteriza-se pelas folhas lanceoladas e largas (96, 97).

A *Araucaria angustifolia* é comumente encontrada em Curitiba no Estado do Paraná. Conseqüentemente são denominados de Pinheiros do Paraná.

Os pinheiros do Paraná são árvores de grande porte, de folhas lanceoladas, ovadas, aciculares e subuladas em disposição espiralada. O tronco é lenhoso e tem um eixo principal com ramificações verticiladas. A raiz primária é persistente, desce profundamente no solo acompanhada de várias ramificações de raízes secundárias. As flores são sempre unissexuais diclinas.

Os cones masculinos são compostos de numerosos microsporófilos e cada microsporófilo tem forma de escamas e transporta 8 microsporângios alongados que se abrem por fendas longitudinais.

Os cones femininos são, geralmente, formados por numerosos macrosporófilos e cada macrosporófilo tem forma de escamas um pouco maiores e são sustentadas por escamas protetoras. Em cada macrosporófilo há um óvulo na face dorsal.

No processo de polinização, que ocorre na primavera, o embrião é impelido para os tecidos do endosperma por um órgão especial, denominado suspensor. O embrião é constituído por dois cotilédones, caule, raiz e suspensor. A raiz prende o embrião ao suspensor.

Durante a formação do embrião, a casca da semente, os macrosporófilos e as escamas protetoras endurecem e se lignificam formando um grande cone maduro. Este cone é composto por unidades isoladas denominadas de pinhão, que são comestíveis (98, 99). A Figura 21 ilustra o pinheiro do Paraná (*Araucaria angustifolia*).

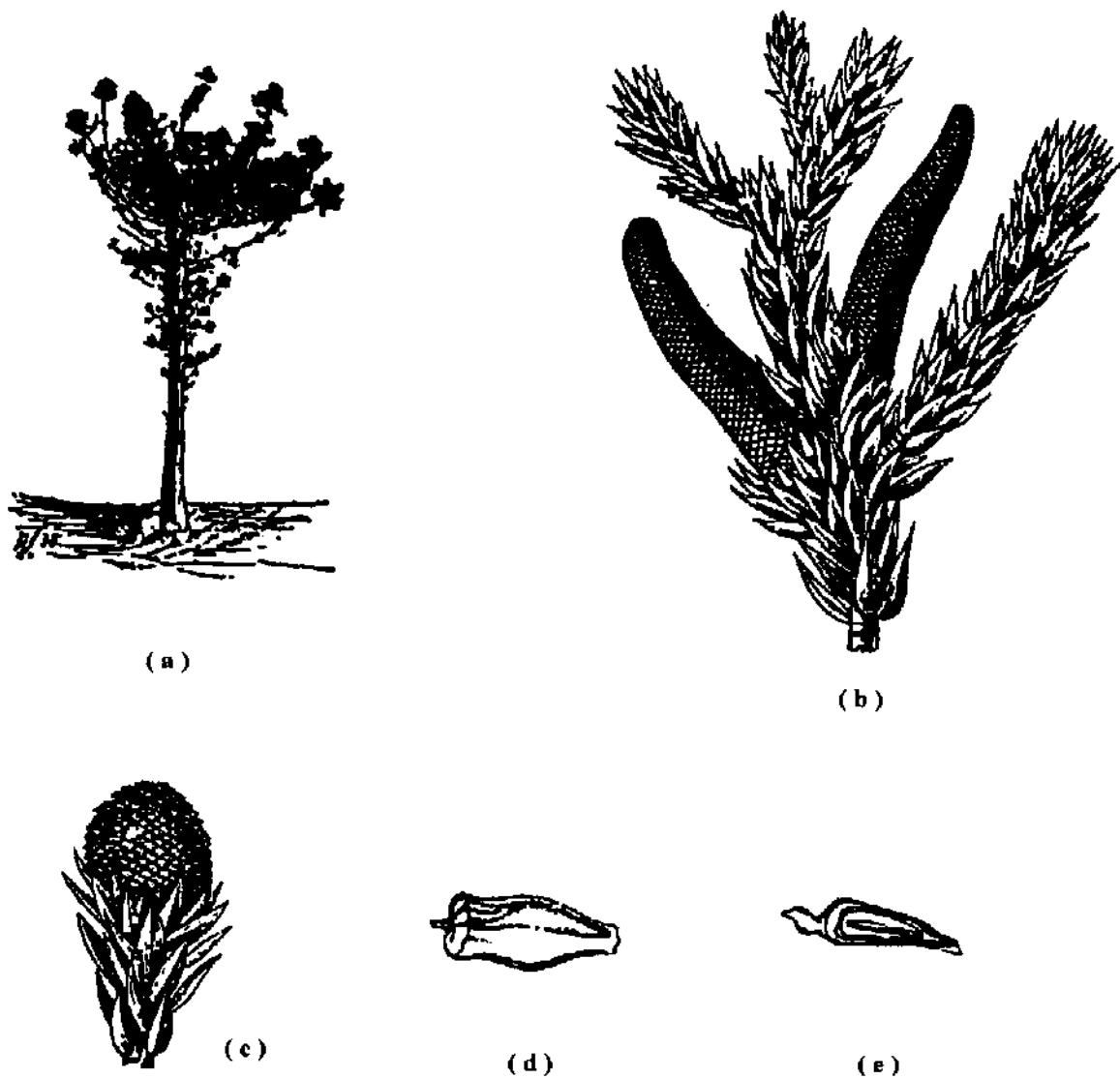


Figura 21. *Araucaria angustifolia*. (a) Pinheiro do Paraná, (b) Galho com cones masculinos, (c) Cones novos femininos, (d) Semente (pinhão), (e) Corte longitudinal de uma semente.

VII.1.2. Objetivo

O objetivo deste trabalho consiste em utilizar tecido de origem vegetal, como uma alternativa às enzimas isoladas e/ou imobilizadas, na construção de biossensores.

Uma fatia do tecido de pinhão (*Araucaria angustifolia*) foi utilizada como fonte de catalase na construção de um biossensor para determinação de peróxido de hidrogênio.

VII.2. Parte experimental

VII.2.1. Aparelhagem

A aparelhagem utilizada é a mesma descrita anteriormente, item VI.2.1., página 59.

VII.2.2. Construção do biossensor

O biossensor baseado no tecido de pinhão foi construído acoplando-se uma fatia fina de tecido de pinhão na extremidade de eletrodo de oxigênio, como mostra a Figura 23.

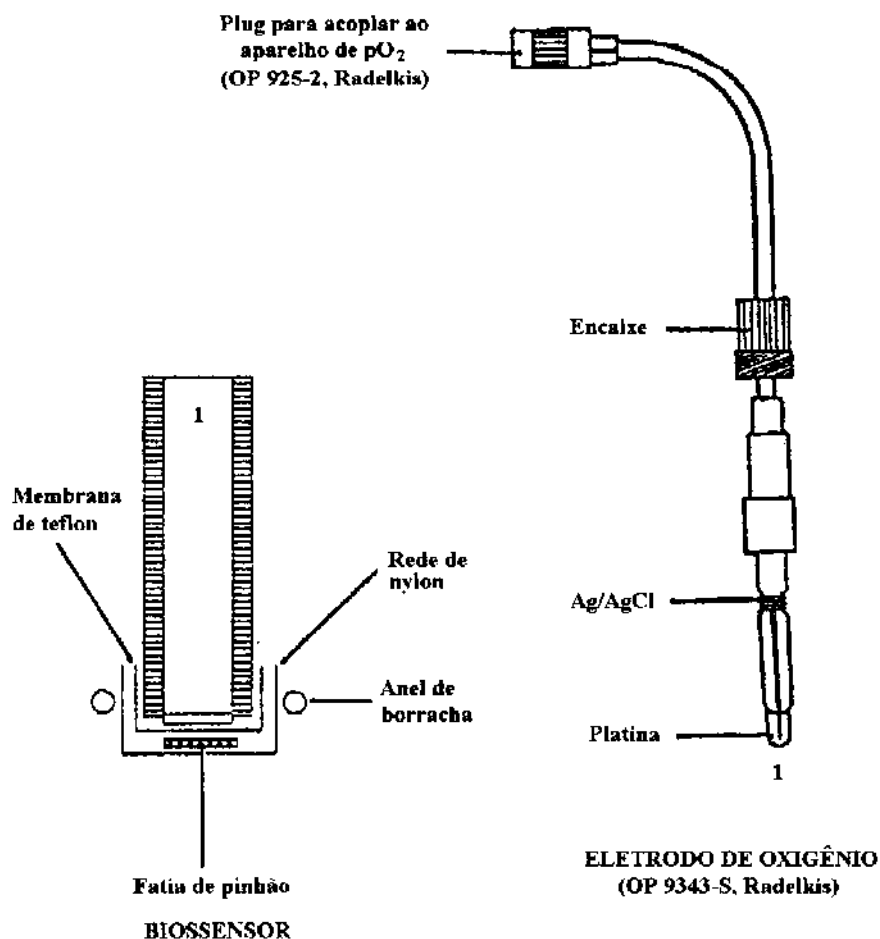


Figura 22. Construção do biossensor baseado no tecido de pinhão

O pinhão foi comprado em supermercado local, descascado e cortado em fatias finas (espessura 1 mm, diâmetro 12mm) com auxílio de um estilete. O seu miolo foi retirado. O tecido de pinhão foi lavado em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0, por uma hora.

A fatia de pinhão foi presa na ponta do eletrodo de oxigênio com uma rede de nylon e um anel de borracha.

VII.2.3. Procedimento

As medidas amperométricas foram feitas mergulhando-se o biossensor baseado no tecido de pinhão em uma célula de acrílico com tampa contendo 1,0 mL de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0.

A célula de medida foi termostatizada à $30,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e a solução tampão fosfato desaerada com nitrogênio. Em seguida, juntou-se solução de peróxido de hidrogênio e, mediu-se a variação da pressão parcial de oxigênio.

Estas medidas foram realizadas sob agitação magnética constante.

VII.3. Resultados e Discussão

A fim de se obter o melhor desempenho do biossensor baseado no tecido de pinhão foram estudados os seguintes parâmetros:

VII.3.1. Efeito do pH

A Figura 23 mostra a influência do pH no tecido de pinhão. A faixa de pH estudada foi de 4,5 a 8,5; preparada a partir de soluções de fosfato de sódio dibásico e de fosfato de potássio monobásico 1/15 mol.L⁻¹.

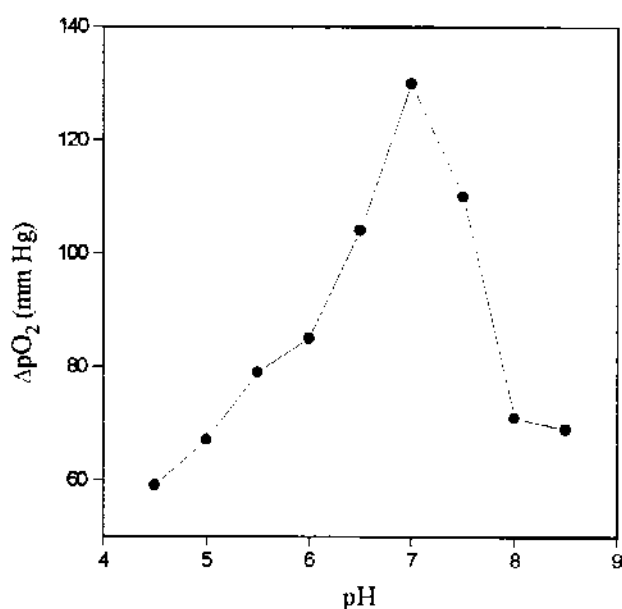


Figura 23. Efeito de pH sobre a resposta do biossensor. Temperatura: 30,0 °C. $[H_2O_2] = 1,3 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹.

As soluções tampão fosfato nos respectivos pHs foram termostatizadas à 30,0 °C. Após a desaeração com nitrogênio, juntou-se 100 μ L de solução de peróxido de hidrogênio 0,0140 mol.L⁻¹. Desta forma, a concentração de H₂O₂ presente foi de $1,3 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹.

Como pode ser observado nesta Figura, a resposta máxima deste biossensor foi obtida em pH 7,0. Conseqüentemente, todos os estudos foram realizados neste pH.

VII.3.2. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre a resposta do biossensor baseado no tecido de pinhão foi investigado variando-se de 15,0 a 32,0 °C.

A célula contendo 1,0 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0 foi termostaticada na temperatura em estudo através de banho. Após a desaeração, foi adicionada 100 µL da solução de peróxido de hidrogênio 0,0103 mol.L⁻¹.

Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados na Figura 24. A Figura mostra a resposta máxima do biossensor nas temperaturas de 30,0 a 32,0 °C.

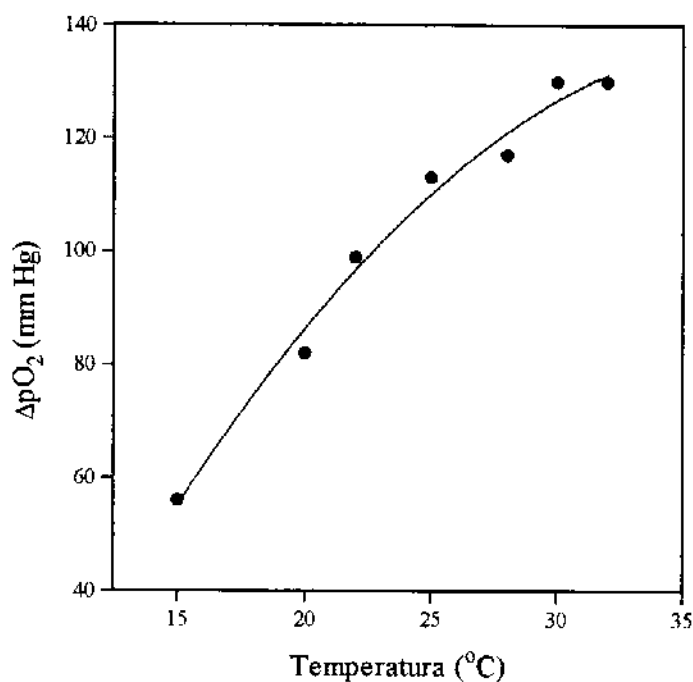


Figura 24. Efeito da temperatura na resposta do biossensor baseado no tecido do pinhão.

Solução tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0 [H₂O₂] = 0,9 × 10⁻³ mol.L⁻¹.

VII.3.3. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio

A curva de calibração de peróxido de hidrogênio obtida utilizando-se o biossensor baseado no tecido de pinhão está apresentada na Figura 25.

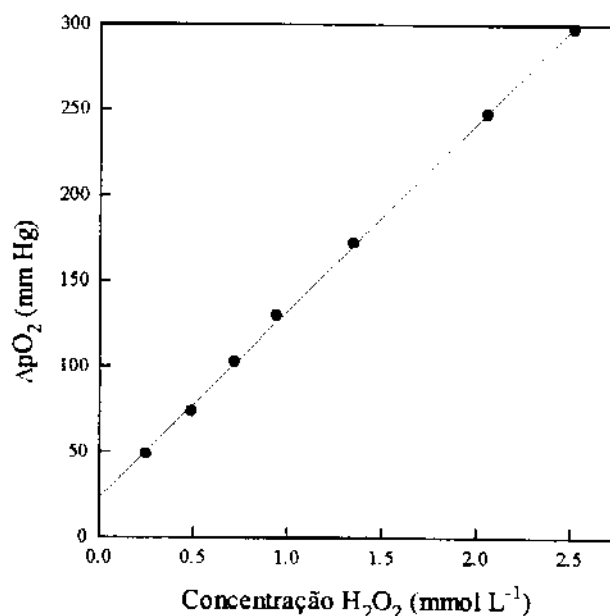


Figura 25. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio. Solução tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹; pH 7,0; Temperatura 30,0°C.

Estes resultados foram obtidos mergulhando-se o biossensor em 1,0 ml de solução tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0, em uma célula termostaticada à 30,0 °C, sob agitação magnética constante. A solução tampão fosfato foi desaerada com nitrogênio antes da adição da solução de peróxido de hidrogênio.

A resposta do biossensor foi linear na faixa de concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ - $2,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio e, pode ser descrita pela equação:

$$y = 109,5(\pm 1,2)x + 23,1(\pm 1,7) \quad r = 0,9997$$

onde y é a variação da pressão parcial de hidrogênio em mmHg e x é a concentração de peróxido de hidrogênio em mol.L⁻¹.

A estimativa do desvio padrão relativo para 6 medidas a $1,2 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de H₂O₂ foi de 1,8 %.

VII.3.4. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio (em unidades de corrente)

A medida do potencial do biossensor baseado no tecido de pinhão foi feita utilizando-se o adaptador de glicose (tipo OP 960, Radelkis) acoplado a um potenciômetro (tipo OP 271, Radelkis).

Estas medidas foram feitas em uma célula contendo 1,0 mL de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0 sob agitação constante e termostatizada à $30,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a desaeração com nitrogênio foi adicionada solução de peróxido de hidrogênio.

A conversão de potencial para corrente foi feita da seguinte maneira: $8,3 \text{ mV}$ de potencial corresponde a $1 \times 10^{-9} \text{ A}$ de corrente (100). Estes resultados estão apresentados na Figura 26.

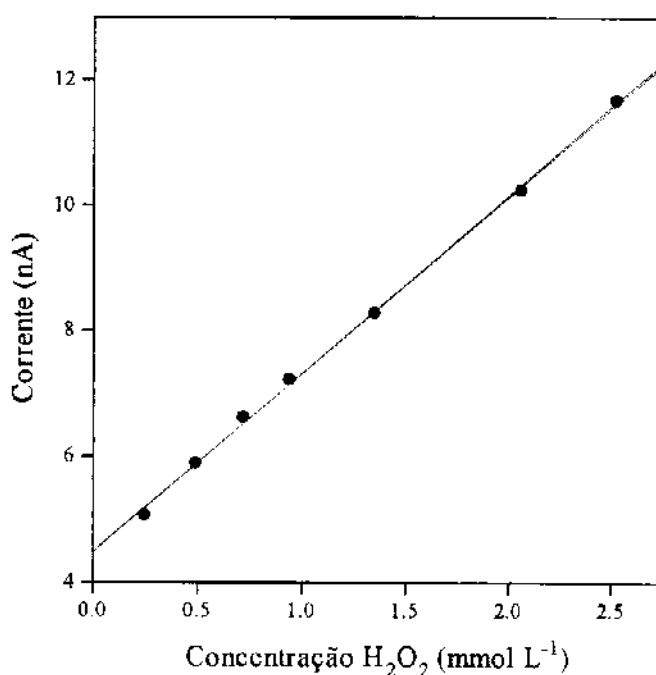


Figura 26. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio (em unidades de corrente).

Tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0; Temperatura: $30,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Como pode ser visto nesta Figura, a faixa linear em unidades de corrente, corresponde àquela obtida nas medidas da pressão parcial de oxigênio.

A equação representativa é:

$$y = 2,8(\pm 0,1)x + 4,5(\pm 0,1) \quad r = 0,9993$$

Vale ressaltar que, o adaptador de glicose sendo portátil e o potenciômetro disponível na maioria dos laboratórios, ao contrário do aparelho de medida pO_2 - pCO_2 , facilitam a realização das medidas.

VII.3.5. Determinação da constante de Michaelis-Menten aparente

A constante de Michaelis-Menten estabelece um valor aproximado para o nível intracelular de um substrato. Desde que K_m é uma contante para uma dada enzima, seu valor numérico é um parâmetro de comparação entre enzimas de diferentes fontes, de tecidos diferentes da mesma fonte ou, até mesmo, do mesmo tecido em diferentes estágios de desenvolvimento.

O valor da constante de Michaelis-Menten aparente encontrado para o biossensor baseado em tecido de pinhão de acordo com a Figura 27 foi $5,7 \text{ mmol.L}^{-1}$. A equação representativa é:

$$y = 24,1(\pm 0,5)x + 4,3(\pm 0,5) \quad r = 0,9993$$

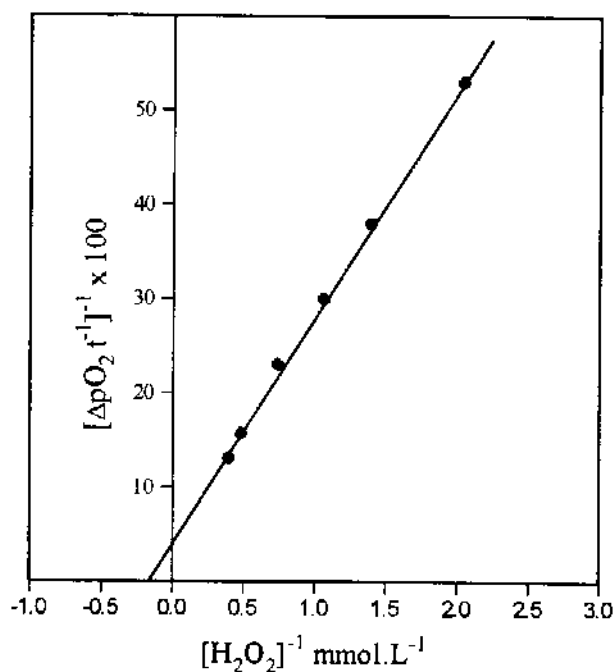


Figura 27. Determinação da constante de Michaelis-Menten aparente para o biossensor baseado em tecido de pinhão.

Comparando-se os valores de K_m encontrados para os biossensores propostos, podemos concluir que o peróxido de hidrogênio apresenta maior afinidade aparente para a enzima catalase do biossensor baseado no extrato enzimático dos besouros bombardeiros do que aquela presente no biossensor baseado no tecido de pinhão. Isto deve-se, provavelmente, a presença de maior quantidade de catalase presente no fluido lançado pelos besouros bombardeiros.

VII.3.6. Efeito de sais

Uma outra tentativa para melhorar a resposta do biossensor baseado no tecido de pinhão foi a utilização de sais cloreto de sódio e cloreto de potássio. Foram testados tanto a lavagem prévia das fatias (concentração $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$) quanto a adição destes sais na solução de medida (concentração $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$). A concentração de peróxido de hidrogênio presente foi de $1,7 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. A Figura 28 mostra que, aparentemente, não ocorreu a abertura das células pelos íons Na^+ ou K^+ , conforme hipótese aventada

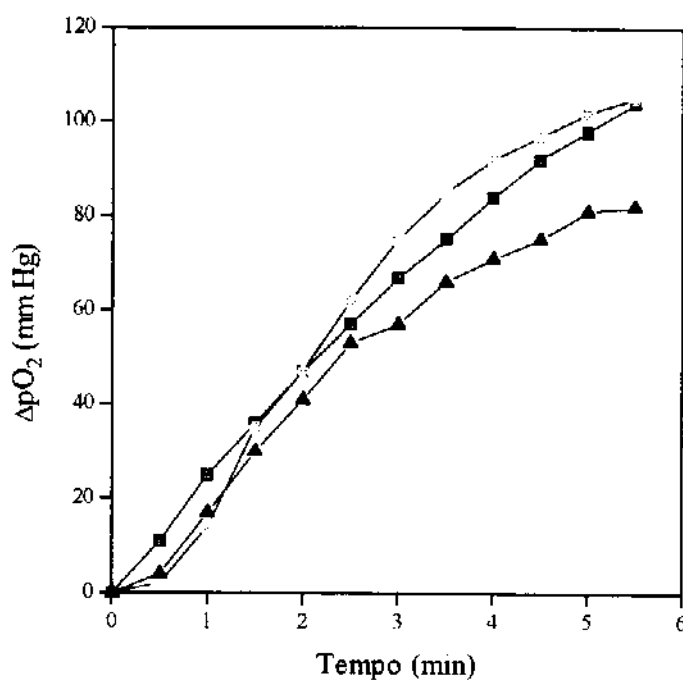


Figura 28. Efeito de sais. ■ Tampão de fosfato; ● Cloreto de sódio; ▲ Cloreto de potássio.
Concentração: $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$

VII.3.7. Efeito de interferentes

O estudo da interferência é apresentado na Figura 29. Ácido ascórbico, catecol, dopamina e hidroquinona não interferem na resposta do biossensor baseado no tecido de pinhão para determinação de peróxido de hidrogênio, desde que o substrato e o interferente sejam adicionados simultaneamente.

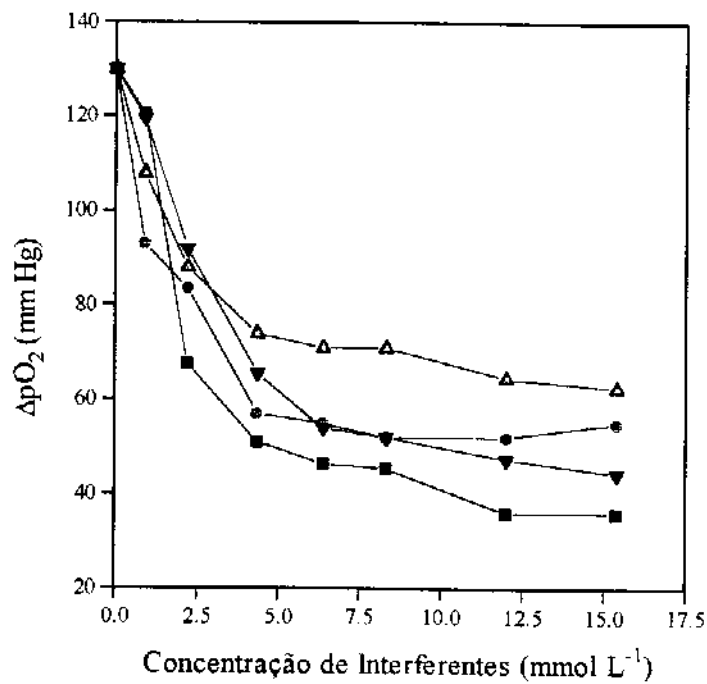


Figura 29. Efeitos de interferentes sobre o biossensor baseado no tecido de pinhão.

■ Ácido ascórbico; ● Catecol; ▲ Dopamina; ▼ Hidroquinona.

VII.3.8. Tempo de vida do biossensor baseado no tecido de pinhão

A resposta do eletrodo baseado no tecido de pinhão foi verificada durante um período de 10 dias.

Este estudo foi realizado em uma célula contendo 1,0 mL de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0, termostaticada à $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e, sob constante agitação. Após a desaeração com nitrogênio foi adicionado $100 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de peróxido de hidrogênio $0,0103 \text{ mol.L}^{-1}$ e, realizadas as medidas da variação da pressão parcial de oxigênio em mmHg. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 30.

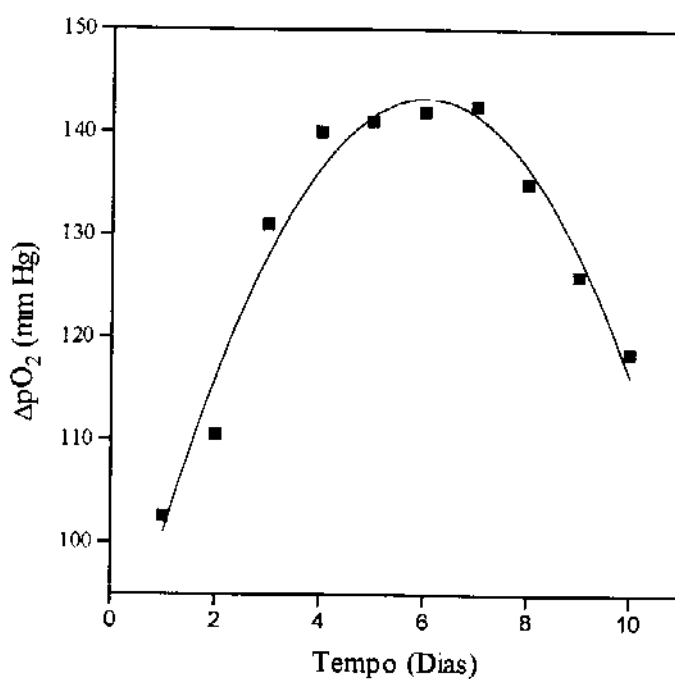


Figura 30. Tempo de vida do biossensor baseado no Tecido de Pinhão. Solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0; Temperatura $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Como pode ser visto na Figura 30, há um aumento na variação da pressão parcial de oxigênio do primeiro ao quarto dia de uso do biossensor baseado no tecido de pinhão.

Este comportamento pode ser devido, provavelmente, a formação de câmaras de difusão na fatia do tecido de pinhão resultando em um aumento concomitante na atividade aparente. Também, pode estar ocorrendo variações na conformação da enzima, de uma conformação não ativa para uma mais estável e preferida.

O decréscimo na resposta deste biossensor após oito dias pode ser devido ao decréscimo na atividade da camada de enzima devido a desnaturação.

Este biossensor foi estocado em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0 e conservado em refrigerador quando não em uso.

VII.4. Conclusão

O tecido de pinhão (*Araucaria angustifolia*) utilizado como fonte natural de catalase possibilitou a construção de um biossensor amperométrico para determinação de peróxido de hidrogênio.

A simplicidade na obtenção e acoplamento da fatia de tecido de pinhão ao eletrodo de oxigênio deve ser ressaltada. As fatias de pinhão foram obtidas com o auxílio de um estilete, dispensando o uso de micrótomo (59). A fatia de tecido de pinhão foi, simplesmente, lavada em solução tampão fosfato para remover possíveis fenóis presentes, antes de se acoplar ao eletrodo de oxigênio. A lavagem destas fatias foi testada com sais cloreto de potássio e cloreto de sódio, numa tentativa de se promover um transporte rápido de substrato para dentro do tecido de pinhão, porém, não mostraram respostas melhores.

O biossensor baseado no tecido de pinhão apresentou resposta linear na faixa de concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ a $2,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio. A linearidade de uma década de concentração é comparável com os biossensores descritos na literatura (79, 80).

É importante salientar que este biossensor pode ser utilizado por oito dias, sem a necessidade de adição de conservantes. O trabalho de Wijesuriya e colaboradores (79), empregaram o azoteto de sódio como conservante e, mesmo assim, foi observado um decréscimo na resposta do biossensor. Já em outros trabalhos este conservante é muito eficiente. O íon azoteto, utilizado para prevenir o desenvolvimento de bactérias é, também, um inibidor de catalase (73, 101, 102).

Vale ressaltar que a utilização de tecidos vegetais na construção de biossensor proporciona medidas diretas, rápidas e de baixo custo. A variedade de sistemas

biocatalíticos encontrados em outros tecidos associados aos elementos eletroquímicos possibilita a construção de novos biossensores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) MOTTOLA, H. A., Enzymes as analytical reagents: Substrate determinations with soluble and with immobilised enzyme preparations, *Analyst* 112, 719 - 726 (1987).
- 2) MARKO-VARGA, G. and DOMÍNGUEZ, E., Enzymes as analytical tools, *Trends Anal. Chem.* 10, 290 - 297 (1991).
- 3) FISHMAN, M. M., Enzymes in analytical chemistry, *Anal. Chem.* 52, 185R - 199R (1980).
- 4) GUILBAULT, G. G., *Enzymatic methods of analysis*, Marcel Dekker, New York (1977).
- 5) GUILBAULT, G. G., *Analytical applications of enzymes*, American Chemical Society, Washington (1987).
- 6) DIXON, M. and WEBB, E. C., *Enzymes*, Academic Press, New York, 3rd Ed. (1979).
- 7) LEHNINGER, A. L., *Bioquímica*, Ed. Edgard Blücher, 2ª Ed., Vol. 1, Cap. 8 (1993).
- 8) GUILBAULT, G. G., *Analytical uses of immobilized enzymes*, Marcel Dekker, New York (1984), pg 14-16.
- 9) BURTIS, C. A. and GEARY, T. D., Glossary of bioanalytical nomenclature, *Pure & Appl. Chem.* 66, 2587 - 2604 (1994).
- 10) RAWN, J. D., *Biochemistry*, Neil Patterson, Burlington, North Carolina, Cap. 7 (1989).
- 11) VOET, D. and VOET, J. G., *Biochemistry*, John Wiley, New York, Cap. 13 (1990).
- 12) SEGEL, I. H., *Biochemical calculations*, John Wiley, New York, Cap. 4 (1976).
- 13) KLIBANOV, A. M., Enzyme stabilization by immobilization, *Anal. Biochem.* 93, 1 - 25 (1979).

- 14) CARR, P. W. & BOWERS, L. D., Immobilized enzymes in analytical chemistry, John Wiley, New York (1980).
- 15) WEETALL, H. H., Immobilized enzymes: Analytical applications, *Anal. Chem.* 46, 602A - 615A (1974).
- 16) WOODWARD, J., Immobilised cells and enzymes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1985).
- 17) THOMPSON, R. Q., MANDOKE, C. S. and WOMACK, J. P., A procedure for immobilizing enzymes on nylon, *Anal. Lett.* 18, 93 - 107 (1985)
- 18) SCOTT, C. D., Immobilized cells: A review of recent literature, *Enzyme Microb. Technol.* 9, 66 - 73 (1987).
- 19) GUILBAULT, G. G., Analytical uses of immobilized enzymes, Marcel Dekker, New York (1984), pg 78-93.
- 20) TREVAN, M. D., Immobilized enzymes, John Wiley, New York (1980).
- 21) KLEI, H. E., SUNDDSTROM, D. W. and SHIM, D., "Immobilisation of enzymes by microencapsulation", in Immobilised cells and enzymes: A practical approach, J. WOODWARD, Ed., IRL Press, Oxford, Cap. 4 (1985).
- 22) WOODWARD, J., "Immobilised enzymes: Adsorption and covalent coupling", in Immobilised cells and enzymes: A practical approach, J. WOODWARD, Ed., IRL Press, Oxford, Cap. 1 (1985).
- 23) ZABORSKY, O. R., Immobilized enzymes, Chem. Rubber Publ. Co., Cleveland, Cap. 4 (1973)
- 24) WALT, D. R. and AGAYN, V. I., The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde, *Trends Anal. Chem.* 13, 425 - 430 (1994).

- 25) GUILBAULT, G. G., Analytical uses of immobilized enzymes, Marcel Dekker, New York (1984), Cap. 4.
- 26) DIEKMANN, R. and HEMPEL, D. C., Immobilization techniques, bioreactors, and improvements in downstream processing, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 613, 255 - 264 (1990).
- 27) WANG, J. and NASER, N., Horseradish-root tissue tubular reactor for flow injection detection of hydrogen peroxide, *Anal. Lett.* 25, 999 - 1009 (1992).
- 28) AMINE, A. and PALLESCHI, G., Investigation of batch measurements with immobilized enzyme reactors and amperometric electrodes, *Electroanalysis* 7, 785 - 787 (1995).
- 29) GORTON, L., CSÖREGI, E., DOMÍNGUEZ, E., EMMÉUS, J., JÖNSSON-PETTERSON, G., MARKO-VARGA, G. and PERSSON, B., Selective detection in flow analysis based on the combination of immobilized enzymes and chemically modified electrodes, *Anal. Chim. Acta* 250, 203 - 248 (1991).
- 30) GILMARTIN, M. A. T. and HART, J. P., Sensing with chemically and biologically modified carbon electrodes, *Analyst* 120, 1029 - 1045 (1995).
- 31) GORTON, L., Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells, *Electroanalysis* 7, 23 - 45 (1995).
- 32) CASS, A. E. G., *Biosensors: A practical approach*, Oxford university press, New York (1990).
- 33) SCOUTEN, W. H., LUONG, J. H. T. and BROWN, R. S., Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design, *TIBTECH* 13, 178 - 185 (1995).

- 34) GUILBAULT, G. G. and OLIVEIRA NETO, G., Immobilised enzyme electrodes, in Immobilised cells and enzymes: A practical approach, J. Woodward, Ed., IRL Press, Oxford, Cap. 5 (1985).
- 35) BARKER, S. A., "Immobilization of the biological component of biosensor" in Biosensors - Fundamentals and Applications, A. P. F. TURNER, I. KARUBE, G. WILSON, EDS., Oxford University Press, Oxford, Cap. 6 (1987).
- 36) JANATA, J., JOSOWICZ, M. and DEVANEY, D. M., Chemical sensors, *Anal. Chem.* 66, 207R - 228R (1994).
- 37) KALCHER, K., KAUFFMANN, J. M., WANG, J., SVANCARA, I., VYTRAS, K., NEUHOLD, C. and YANG, Z., Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: A review with particular emphasis on the period 1990 -1993, *Electroanalysis* 7, 5 - 22 (1995).
- 38) FATIBELLO FILHO, O. e CAPELATO, M. D., Biosensores, *Quim. Nova* 15, 28 - 39 (1992).
- 39) CLARK, L. and LYONS, C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102, 29 - 45 (1962)
- 40) UPDIKE, S. J. and HICKS, G. P., The enzyme electrode, *Nature* 214, 986 - 988 (1967).
- 41) BRETT, A. M. C. F. O., GIL, M. H. and PIEDADE, A. P., An electrochemical bienzyme membrane sensor for free cholesterol, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 28 105-115 (1992).
- 42) LATHIKA, K. M., INAMDAR, K. V., TARACHAND, U., SINGH, B. B. and RAGHAVAN, K. G., Determination of urinary oxalate using banana oxalate oxidase: Comparison with immobilized enzyme, *Anal. Lett.* 28, 425 - 442 (1995).

- 43) MATSUKURA, R., ALEIXO, L. M., GODINHO, O. E. S. and OLIVEIRA NETO, G.,
Determination of glucose in instant coffee with an enzyme electrode, *Anal. Chim. Acta.* 280, 49 - 52 (1993)
- 44) REBELO, M. J. F., COMPAGNONE, D., GUILBAULT, G. G. and LUBRANO, G. J.,
Alcohol electrodes in beverage measurements, *Anal. Lett.* 27, 3027 - 3037 (1994).
- 45) DENNISON, M. J. and TURNER, A. P. F., Biosensor for environmental monitoring,
Biotech. adv. 13, 1-12 (1995).
- 46) SCHELLER, F., SCHUBERT, F., PFEIFFER, D., HINSTSCHE, R., DRANSFELD,
I., RENNEBERG, R., WOLLENBERGER, U., RIEDEL, K., PAVLOVA, M.,
KÜHN, M. MÜLLER, H-G., TAN, P. M., HOFFMANN, W. and MORITZ, W.,
Research and development of biosensors, *Analyst* 114, 653 - 666 (1989).
- 47) VADGAMA, P. and CRUMP, P. W., Biosensors: Recent trends, *Analyst* 117, 1657 -
1670 (1992).
- 48) SHARMA, A. and ROGGERS, K. R., Biosensors, *Meas. Sci. Technol.* 5, 461 - 472
(1994).
- 49) TURNER, A. P. F., KARUBE, I. and WILSON, G., *Biosensors - Fundamentals and
applications*, Oxford University Press, Oxford (1987).
- 50) LOWE, C.R., Biosensors: Concepts and applications, in "Chemically modified surfaces
in science and industry, D. E. LEYDEN and W. T. COLLINS, Gorton and Broach
Sci. Publ., New York, Vol. 2 pag. 19 -34 (1988).
- 51) OLIVEIRA NETO, G. e YAMANAKA, H., Enzimas e materiais biológicos
imobilizados: Biossensores, *Quimica Nova* 11, 432 - 435 (1988).
- 52) GUILBAULT, G. G., *Analytical uses of immobilized enzymes*, Marcel Dekker, New
York (1984), Cap 3.

- 53) ARNOLD, M. A., An introduction to biocatalytic membrane electrodes, *Amer. Lab.* 15, 34 - 40 (1983).
- 54) RECHNITZ, G. A., Bioselective membrane electrodes probes, *Science* 214, 287 - 291 (1981).
- 55) RECHNITZ, G. A., "Bioselective membrane electrodes using tissue materials as biocatalysts", in *Methods in Enzymology*, K. MOSBACH, Ed. Academic Press, San Diego, Vol. 137 (1988).
- 56) SIDWELL, J. S. and RECHNITZ, G. A., Progress and challenges for biosensors using plant tissue materials, *Biosensors* 2, 221 - 233 (1986).
- 57) RECHNITZ, G. A. and HO, M. Y., Biosensors based on cell and tissue material, *J. Biotechnol.* 15, 201 - 218 (1990).
- 58) ARNOLD, M. A. and RECHNITZ, G. A., "Biosensors based on plant and animal tissue", in *Biosensors: Fundamentals and Applications*, A. P. F. TURNER, I. KARUBE and G. S. WILSON, Eds., Oxford University Press, New York, Cap. 3 (1987).
- 59) BOTRE, F., MAZZEI, F., LANZI, M., LORENTI, G. and BOTRE, C., Plant-tissue electrode for the determination of catechol, *Anal. Chim. Acta* 255, 59 - 62 (1991).
- 60) WANG, J. and NASER, N, Amperometric biosensing of cinnamic acid using a spinach-based biocatalytic electrode, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 27, 441 - 447 (1992)
- 61) GAZARYAN, I. G., LOGINOV, D. B., LIALULIN, A. L. and SHEKHOVTSOVA, Determination of phenols using peroxidases, *Anal. Lett.* 27, 2917 - 2930 (1994).
- 62) NAVARATNE, A., LIN, M. S. and RECHNITZ, G. A., Eggplant -based bioamperometric sensor for the detection of catechol, *Anal. Chim. Acta* 237, 107 - 113 (1990)

- 63) OZSOZ, M. and WANG, J., Tomato seed- based amperometric sensor for the determination of alcohols, *Electroanalysis* 3, 655 - 658 (1991).
- 64) OUNGPIPAT, W. and ALEXANDER, P. W., An amperometric bi-enzyme sensor for glycolic acid determination based on spinach tissue and ferrocene-mediation, *Anal. Chim. Acta* 295, 37 - 46 (1994).
- 65) CHEN, L., LIN, M. S., HARA, M. and RECHNITZ, G. A., A kohlrabi - based amperometric biosensor for hydrogen peroxide measurement *Anal. Lett.* 24 1 - 14 (1991)
- 66) YIFENG, T., A plant tissue electrode based on the use of chemical mediators, *Anal. Lett.* 26, 1557 - 1566 (1993).
- 67) DESHPANDE, M. V. and HALL, E. A. H., An electrochemically grown polymer as an immobilisation matrix for whole cells: Application in an amperometric dopamine sensor, *Biosens. Bioelectr.* 5, 431 - 448 (1990).
- 68) LIN, M. S., THAM, S. Y. and RECHNITZ, G. A., Pineapple-tissue based bioelectrode for the determination of hydrogen peroxide, *Electroanalysis* 2, 511 - 516 (1990).
- 69) UCHIYAMA, S. and RECHNITZ, G. A., Biosensors using flowers as catalytic material, *Anal. Lett.* 20, 451 - 470 (1987).
- 70) RECHNITZ, G. A., Biochemical electrodes uses tissue slice, *Chem. Eng. News* 56, 16 (1978).
- 71) RECHNITZ, G. A., ARNOLD, M. A. and MEYERHOFF, M. E., Bio-selective membrane electrode using tissue slices, *Nature* 278, 466 - 467 (1979).
- 72) ARNOLD, M. A. and RECHNITZ, G. A., Optimization of a tissue-based membrane electrode for guanine, *Anal. Chem.* 54, 777 - 782 (1982).

- 73) MASCINI, M., IANNELLO, M. and PALLESCHI, G., A liver tissue- based electrochemical sensor for hydrogen peroxide, *Anal. Chim. Acta* 138, 65 - 69 (1982).
- 74) AIZAWA, M., KARUBE, I. and SUZUKI, S., A specific bio-electrochemical sensor for hydrogen peroxide, *Anal. Chim. Acta* 69, 431 - 437 (1974).
- 75) UCHIYAMA, S. and RECHNITZ, G. A., Biosensors using flowers petal structures, *J. Electroanal. Chem.* 222, 343 - 346 (1987).
- 76) SMIT, N. and RECHNITZ, G. A., Leaf based biocatalytic membrane electrodes, *Biotechnol. Lett.* 6, 209 - 214 (1984).
- 77) SCHUBERT, F., WOLLENBERGER, U. and SCHELLER, F., Plant tissue- based amperometric tyrosine electrode, *Biotechnol. Lett.* 5, 239 - 242 (1983).
- 78) FANG, Y., CAI, R., DENG, J. and DENG, Z., Lettuce seed meal tissue-based membrane electrode with high biocatalytic activity for hydrogen peroxide, *Electroanalysis* 4, 819 - 822 (1992).
- 79) WIJESURIYA, D., LIN, M. S. and RECHNITZ, G. A., Grape tissue -based electrochemical sensor for the determination of hydrogen peroxide, *Anal. Chim. Acta* 234, 453 - 457 (1990).
- 80) CIUCU, A., MAGEARU, V. and LUCA, C., Enzyme electrode sensor for hydrogen peroxide, *Anal. Lett.* 18, 299 - 313 (1985).
- 81) GALLO, D., NAKANO, O., WIENDL, F. M., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R. P. L., *Manual de Entomologia*, Ed. Agronômica Ceres, São Paulo, pag 73 - 80 (1970)
- 82) WHITMAN, D. W., BLUM, M. S. and ALSOP, D. W., Allomones: Chemicals for defense, in *Insect defenses*, D. L. EVANS and J. O. SCHMIDT, Ed., State University of New York Press. New York, Cap. 12 (1990).

- 83) BLUM, M. S., Biochemical defenses of insects, in *Biochemistry of insects*, M. ROCKSTEIN, ED., Academic Press, New York, Cap. 11 (1978).
- 84) EISNER, T., JONES, T. H., ANESHANSLEY, D. J., TSCHINKEL, W. R., SILBERGLIED, R. E. and MEINWALD, J., Chemistry of defensive secretions of bombardier beetles (Brachinini, Metriini, Ozaenini, Paussini), *J. Insect Physiol.* 23, 1383 - 1386 (1977).
- 85) ZINNER, K. Besouros Bombardeiros, *Ciência Hoje* 54 50 - 56 (1989).
- 86) LIMA, A. C., *Insetos do Brasil, Coleopteros 1ª parte*, Escola Nacional de Agronomia, Serie Didática Nº 9, Vol. 7 (1952).
- 87) SCHILDKNECKT, H., Zur chemie des bombardierkäfers, *Angew. Chem.* 69, 62 - 63 (1957).
- 88) SCHILDKNECHT, H. and HOLOUBEK, K., Die bombardierkäfer und ihre explosions-chemie, *Angew. Chem.* 73, 1 - 7 (1961).
- 89) SCHILDKNECHT, H., MASCHWITZ, E. and MASCHWITZ, U., Die explosionschemie der bombardierkäfer: Struktur und eigenschaften der brennkamm erenzyme, *J. Insect Physiol.* 16, 749 - 789 (1970).
- 90) SCHILDKNECHT, H., MASCHWITZ, E. und MASCHWITZ, U., Die explosionschemie der bombardierkäfer (Coleoptera, Carabidae), *Z. Naturforsch.* 23b, 1213 - 1218 (1968)
- 91) ANESHANSLEY, D. J., EISNER, T., WIDOM, J. M. and WIDOM, B., Biochemistry at 100 °C: Explosive secretory discharge of bombardiers beetles, *Science* 165, 61 - 63 (1969)
- 92) ANESHANSLEY, D. J., JONES, T. H., ALSOP, D., MEINWALD, J. and EISNER, T., Thermal concomitants and biochemistry of the explosive discharge mechanism of some little known bombardier beetles, *Experientia* 39, 366 - 368 (1983).

- 93) PESCHKE, K., SCHMITT, K. and ZINNER, K., Occurrence of electronically excited products during the defensive reaction of bombardier beetles, *Photobiochem. and Photobiophys.* 12, 275 - 282 (1986).
- 94) DEAN, J., Defensive reaction time of bombardier beetles, *J. Chem. Ecol.* 5, 691 - 701 (1979).
- 95) EISNER, T., The protective rôle of the spray mechanism of the bombardier beetle, *J. Insect Physiol.* 2, 215 - 220 (1958).
- 96) JOLY, A. B., *Botânica - Introdução a taxonomia vegetal*, Companhia Editora Nacional, São Paulo, pag. 202 - 205 (1966).
- 97) WEBERLING, F. and SCHWANTES, H. O., *Taxionomia vegetal*, Ed. Pedagógica e Universitária, São Paulo, pág. 281 (1986).
- 98) SCHULTZ, A., *Introdução à botânica sistemática*, Ed. Sagra, RGS, 6ª Ed., Vol. 2, pg. 27 - 35 (1990).
- 99) RAVEN, P. H., EVERT, R. F. e CURTIS, H., *Biologia vegetal*, Ed Guanabara Dois, R.J., 2ª Ed., Cap. 16 (1985).
- 100) HAVAS, J., PORJESZ, E., NAGY, G and PUNGOR, E., Glucose selective sensor. Determination of glucose content of blood and urine, *Hungarian Scientific Instruments* 1980/49, pg 53 - 59 (1980).
- 101) AGNER, K. and THEORELL, H., On the mechanism of the catalase inhibition by anions, *Arch. Biochem.* 10, 321 - 338 (1946).
- 102) WEBB, J. L., *Enzyme and metabolic inhibitors*, Academic Press, New York, Vol. I (1963).
-