



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabalho de Conclusão de Curso

Construção de Biossensor Contendo Peroxidase para Determinação de Ácido Cafeico em Vinho Branco

Graduanda: Suellen Cadorin Fernandes

Orientadora: Prof^a Dr^a Iolanda da Cruz Vieira

Florianópolis, Agosto de 2006

Suellen Cadorin Fernandes

Construção de Biossensor Contendo Peroxidase para Determinação de Ácido Cafeico em Vinho Branco

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à disciplina QMC 5510 –
Estágio Supervisionado, do curso de
Química.

Coordenadora de Estágio: Prof^a Dr^a Iolanda da Cruz Vieira.

Orientadora de Estágio: Prof^a Dr^a Iolanda da Cruz Vieira

Florianópolis, Agosto de 2006.

AGRADECIMENTOS

- ❖ À Deus sempre presente em minha vida!
- ❖ Aos meus pais, Lauro e Matilde, por todo incentivo e amor. Nada seria suficiente para demonstrar minha gratidão a vocês!!!
- ❖ Um agradecimento especial à Prof^a Dr^a Iolanda da Cruz Vieira pela oportunidade e paciência durante todo o trabalho.
- ❖ À Doutoranda Inês que sempre me ajudou e se tornou uma amiga muito especial...
- ❖ À minha grande família, em especial meus tios Luiz, Léa e minha prima Nicolle que me acolheram e se tornaram minha segunda família.
- ❖ À Dna. Hilda que sempre torceu pelo meu sucesso e sempre me enviou pensamentos positivos!!!
- ❖ Ao meu amor Luciano. (Was were ich wenn ich dich nicht hätte!)
- ❖ Essa vitória também é compartilhada com os amigos do curso de química que fizeram parte desta fase maravilhosa e ficarão guardados eternamente comigo.
- ❖ Aos professores do departamento de química que compartilharam seus conhecimentos e contribuíram para a conclusão deste trabalho!
- ❖ Aos colegas do laboratório Quitech pela ajuda e companheirismo durante esses anos...
- ❖ Aos meus amigos de sempre: Lana & Rafa, Priscila, Diogo, Rafael e Jaqueline.
- ❖ À UFSC e ao CNPq pelo apoio financeiro...

Sumário

Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	viii
Glossário	ix
Resumo	x
1. Introdução	
1.1. Enzimas	01
1.2. Cinética Química	02
1.3. Desempenho das Enzimas	04
1.4. Enzima Peroxidase	04
1.5. Imobilização do Material Biológico	05
1.6. Quitina	06
1.7. Biossensores	07
1.8. Ácido Cafeico	08
1.9. Métodos Eletroanalíticos	08
2. Objetivos	
2.1. Objetivo geral	10
2.2. Objetivo Específico	10
3. Parte Experimental	
3.1. Equipamentos	11
3.2. Reagentes e Soluções	11
4. Procedimento Experimental	
4.1. Obtenção da enzima peroxidase	12
4.2. Determinação da atividade, proteína total e atividade específica da peroxidase	13

4.3.	Obtenção da quitina dos gládios de lula	13
4.4.	Infravermelho da quitina	14
4.5.	Reticulação da quitina com epícloridrina e glutaraldeído	14
4.6.	Imobilização da peroxidase em matriz de quitina	14
4.7.	Preparação do biossensor	15
4.8.	Medidas eletroanalíticas	15
5. Resultados e Discussão		
5.1.	Enzimas obtidas de diferentes tecidos vegetais	16
5.2.	Reação enzimática	17
5.3.	Estudo de pH	18
5.4.	Estudo de inibidores	18
5.5.	Estudo de substratos	19
5.6.	Determinação do grau de desacetilação e acetilação da quitina obtida de gládios de lula	20
5.7.	Reticulação da quitina e imobilização da peroxidase	22
5.8.	Processo enzimático	23
5.9.	Voltametria cíclica	24
5.10.	Otimização e desempenho do biossensor	25
5.11.	Estabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade	26
5.12.	Curva analítica	28
5.13.	Estudo de adição e recuperação e determinação de ácido cafeico em vinho branco	28
6. Conclusão		30
Referências Bibliográficas		31
Artigos e apresentações em congressos		36

Lista de Figuras

Figura 1.	Molécula de enzima e seu sítio ativo.	01
Figura 2.	Efeito da concentração do substrato na velocidade de reação para uma reação catalisada por enzimas.	03
Figura 3.	Estrutura da enzima peroxidase.	04
Figura 4.	Métodos de imobilização do material biológico.	05
Figura 5.	Estrutura da celulose.	06
Figura 6.	Estrutura da quitina.	06
Figura 7.	Esquema de um biossensor.	07
Figura 8.	Estrutura química do ácido cafeico.	08
Figura 9.	(A) Sinal de excitação em forma de onda triangular linear e o (B) voltamograma obtido da voltametria cíclica.	09
Figura 10.	Reação enzimática da peroxidase.	17
Figura 11.	Efeito do pH (5 a 8) sobre a resposta espectrofotométrica da peroxidase com guaiacol e peróxido de hidrogênio.	18
Figura 12.	Reação do catecol à o-quinona.	20
Figura 13.	Espectros de infravermelho da (a) quitina pura e (b) quitina de lula.	21
Figura 14.	Reação entre quitina, glutaraldeído, epícloridrina e a enzima.	23
Figura 15.	Esquema do processo enzimático entre ácido cafeico, peróxido de hidrogênio e peroxidase.	24
Figura 16.	Voltamogramas cíclicos obtidos usando o biossensor proposto em solução tampão fosfato (pH 7) para: (a) peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ e ácido cafeico (b) $4,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , (c) $8,0 \times 10^{-5}$, (d) $1,2 \times 10^{-4}$ (e) $1,6 \times 10^{-4}$ e solução de peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹ .	25
Figura 17.	Estudo da estabilidade do biossensor contendo solução de ácido cafeico $1,2 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ e solução de peróxido	27

de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7.

Figura 18. Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica obtida usando o biossensor contendo (a) solução tampão fosfato e solução peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e adição de ácido cafeico de (b) $2,0 \times 10^{-5}$ (c) $4,0 \times 10^{-5}$; (d) $8,0 \times 10^{-5}$; (e) $1,2 \times 10^{-4}$; (f) $1,6 \times 10^{-4}$; (g) $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em 50 mV de amplitude e frequência de 80 Hz.

28

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tipo de reação catalisada pelos diferentes grupos de enzimas.	02
Tabela 2. Atividade enzimática da peroxidase obtida de vegetais.	16
Tabela 3. Estudo da inibição da peroxidase na presença de diferentes substâncias.	19
Tabela 4. Atividade da peroxidase em guaiacol e catecol.	20
Tabela 5. Parâmetros de otimização do biossensor.	26
Tabela 6. Estudo de adição e recuperação de ácido cafeico em vinho branco.	29

Glossário

m = massa

E = enzima

S = substrato

P = produto

ES = complexo enzima-substrato

K_m = constante de Michaelis-Menten

V = velocidade da reação

V_m = velocidade máxima

K_{-1} , K_1 e K_2 = constantes de velocidade

I_{pa} = corrente de pico anódico

I_{pc} = corrente de pico catódico

E_{pa} = potencial de pico anódico

E_{pc} = potencial de pico catódico

A = absorvância

IV = infravermelho

Resumo

Neste trabalho extraiu-se a enzima peroxidase da vagem (*Phaseolus vulgaris*) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) que foi imobilizada em suporte de quitina obtida de gládios de lula e empregada na construção de biossensores. A quitina foi reticulada usando o glutaraldeído que atua sobre os grupos aminos e a epícloridrina agindo sobre os grupos acetamido. Os biossensores de pasta de carbono foram construídos a partir de 10:75:15% m/m de quitina contendo 1200 unidades/ mL de enzima, pó de grafite e nujol, respectivamente. A maior resposta analítica foi obtida em pH 7, frequência de 80 Hz, amplitude de 50 mV e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} usando a voltametria de onda quadrada. A partir dos melhores parâmetros construiu-se a curva analítica para ácido cafeico que apresentou uma linearidade de $2,0 \times 10^{-5}$ a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0,9990$) e limite de detecção de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade usando uma solução $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cafeico e $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) foi de 4 e 13 %, respectivamente. O estudo de adição e recuperação de ácido cafeico em amostras de vinho branco foi de 90,7 a 105,0 %.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enzimas

Enzimas são na sua grande maioria, proteínas que atuam como catalisadores no sistema biológico a uma velocidade de 10^6 a 10^{12} vezes maior se comparado com as reações correspondentes sem catálise enzimática. Elas diminuem a barreira energética entre reagentes e produtos sem alterar a constante de equilíbrio ou a variação de energia livre. Possuem características marcantes como alta especificidade e poder catalítico quando se encontra na sua maioria, em condições moderadas de pH, temperatura, meio iônico, entre outras¹⁻⁵.

Apenas uma região restrita da enzima está envolvida no processo de catálise. A mesma é denominada sítio ativo, onde encontram-se resíduos de aminoácidos que participam diretamente na quebra e formação de ligações. Algumas enzimas dependem de cofatores que podem ser pequenas moléculas orgânicas ou íons metálicos para a atividade catalítica^{6,7}. A Figura 1 ilustra uma molécula de enzima e seu sítio ativo.

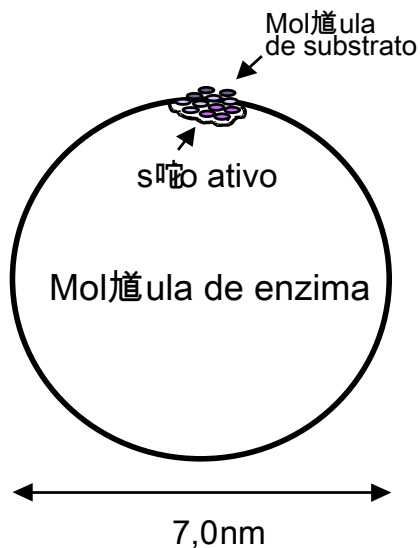


Figura 1. Molécula de enzima e seu sítio ativo.

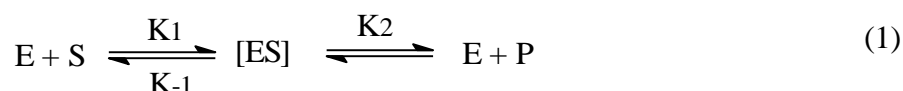
As enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reações por elas catalisadas e são divididas em seis grupos majoritários (Tabela 1)¹:

Tabela 1: Tipo de reação catalisada pelos diferentes grupos de enzimas.

Grupo de enzimas	Tipo de reação
Óxido-redutases	Oxidação-redução
Transferases	Transferência de grupos
Hidrolases	Hidrólise de compostos
Liasas	Remoção não hidrolítica de grupos
Isomerases	Isomerização
Ligases	Junção de duas moléculas com ruptura na ligação pirofosfato

1.2. Cinética química

O conhecimento da cinética enzimática é importante para entender as propriedades e o comportamento das enzimas e também o seu mecanismo de ação. Reações enzimáticas que envolvem apenas um substrato reagem formando complexo enzima – substrato para posterior formação de produto (equação 1):



Quando a concentração do substrato é muito alta, o equilíbrio será deslocado para a direita de acordo com a lei de ação das massas e toda enzima estará complexada na forma [ES]. Posteriormente, o complexo [ES] é desfeito da forma contínua e rápida, liberando o produto e deixando a enzima livre para combinar-se com outra molécula de substrato [S]. Assim, o equilíbrio estacionário é atingido e a reação alcança a sua velocidade máxima.

Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Menten definiram uma constante (K_m) para estabelecer a relação entre a concentração do substrato e a velocidade da reação enzimática, sendo que a curva da concentração do substrato pela velocidade da reação possui a mesma forma para a maioria das enzimas (Figura 2).^{1,3}

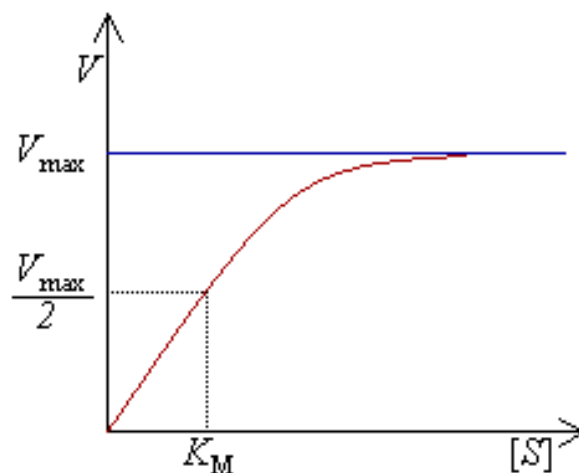


Figura 2. Efeito da concentração do substrato na velocidade de reação para uma reação catalisada por enzima.

A equação de Michaelis-Menten (equação 2) expressa a cinética da ação enzimática^{1,8-9}.

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

onde: V = velocidade inicial de reação

V_m = velocidade máxima

K_m = constante de Michaelis-Menten = $(K_{-1} + K_2) / K_1$

$[S]$ = concentração do substrato

1.3. Desempenho das enzimas

Vários fatores como concentração da enzima e do substrato, pH, temperatura, ativadores e inibidores podem afetar a velocidade das reações enzimáticas.

Os inibidores podem ser do tipo irreversíveis ou reversíveis. Muitos venenos e drogas possuem a habilidade de inibir enzimas específicas. Esta inibição pode ser irreversível, modificando ou destruindo grupos funcionais ou cofatores necessários para a atividade da enzima. A inibição reversível pode ocorrer de duas maneiras: não-competitiva, onde o inibidor combina reversivelmente com a enzima (sem ser o sítio ativo) e competitiva, quando um composto semelhante ao substrato compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima⁷.

1.4. Enzima peroxidase

A peroxidase, EC 1.11.1.7 (Figura 3) faz parte do grupo de enzimas chamadas de óxido-redutase e está relacionada com a perda de sabor, cor, textura e qualidade nutricional dos alimentos¹⁰⁻¹¹. Ela catalisa a oxidação de substratos doadores de prótons como fenóis, aminas e outros compostos orgânicos quando em presença do peróxido de hidrogênio^{8,10-13}.



Figura 3. Representação gráfica da enzima peroxidase¹⁴.

1.5. Imobilização do material biológico

Apesar de suas limitações em termos da sua susceptibilidade ao pH, força iônica, inibidores e baixa estabilidade, as enzimas são amplamente utilizadas juntamente com a pasta de carbono para construção de biossensores.

Comparadas com enzimas livres em solução, as enzimas imobilizadas são mais resistentes a mudanças de ambientes, podem ser usadas continuamente, além de conseguir recuperar tanto a enzima quanto o produto da reação¹⁵. Vários métodos são utilizados para imobilização da enzima em diferentes suportes para posterior construção de biossensores. Entre eles, os mais utilizados são aqueles envolvendo adsorção, ligação covalente, ligação covalente cruzada com um reagente multifuncional e a oclusão em géis ou membranas como mostra a Figura 4^{8,16}.

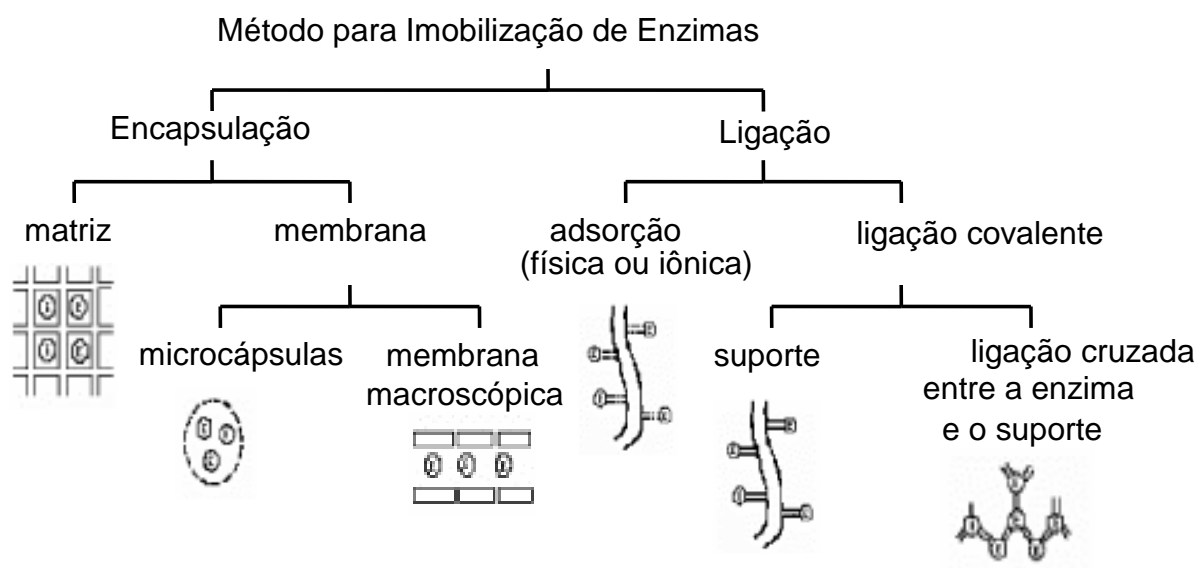


Figura 4. Métodos de imobilização do material biológico.

1.6. Quitina

A quitina é um polímero natural encontrado em insetos, crustáceos, penas de lulas, e em menor quantidade nas plantas, fungos e bactérias¹⁷⁻²¹. Este biopolímero é semelhante à estrutura da celulose (Figura 5) que apresenta na posição do carbono 2 um grupo hidroxila. Nesta mesma posição, a quitina (Figura 6) possui um grupamento acetamida^{19,21-22}. Por ser um polímero biodegradável, não-tóxico, possui excelente adsorção entre outras propriedades, atualmente é aplicado em várias áreas tecnológicas, como na manufatura de papel, uso medicinal e farmacêutico, tratamento de efluentes industriais, entre outros^{17,20,22}.

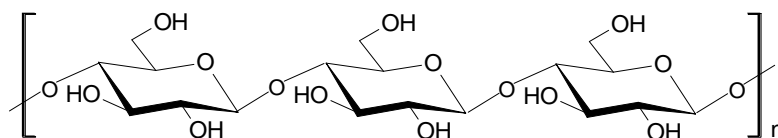


Figura 5. Estrutura da celulose.

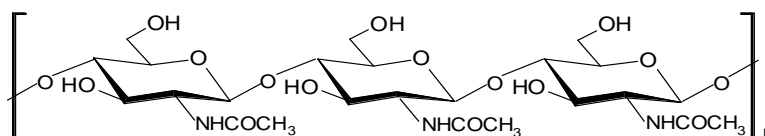


Figura 6. Estrutura da quitina.

Quando os grupos acetila da quitina são removidos obtém-se a quitosana. Esta desacetilação pode ser observada usando o espectro de infravermelho com o desaparecimento da banda carbonila da amida (1655 cm^{-1}). Outros métodos, como a espectroscopia de absorção molecular (UV-vis), potenciometria, condutimetria, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 e medidas de dicroísmo circular são utilizados para a determinação da desacetilação da quitina^{17,20,23-26}.

1.7. Biossensores

Um biossensor é um dispositivo que conectado a um transdutor converte um sinal biológico (proveniente de enzimas, anticorpos, antígenos, organismos, tecido animal e vegetal) em sinal elétrico. O material biológico pode ser imobilizado em um suporte sólido ou em uma membrana adequada acoplada junto à superfície do transdutor, onde será monitorado o desaparecimento de algum reagente ou o aparecimento de algum produto da reação do material biológico com o substrato de interesse como mostrado na Figura 7^{8,27-29}.

De acordo com o transdutor utilizado, o biossensor pode ser classificado como eletroquímico (potenciométrico, amperométrico e condutimétrico), óptico (luminescência, fluorescência e elipsimetria) e detector de massa (cristais piezelétricos)²⁸.

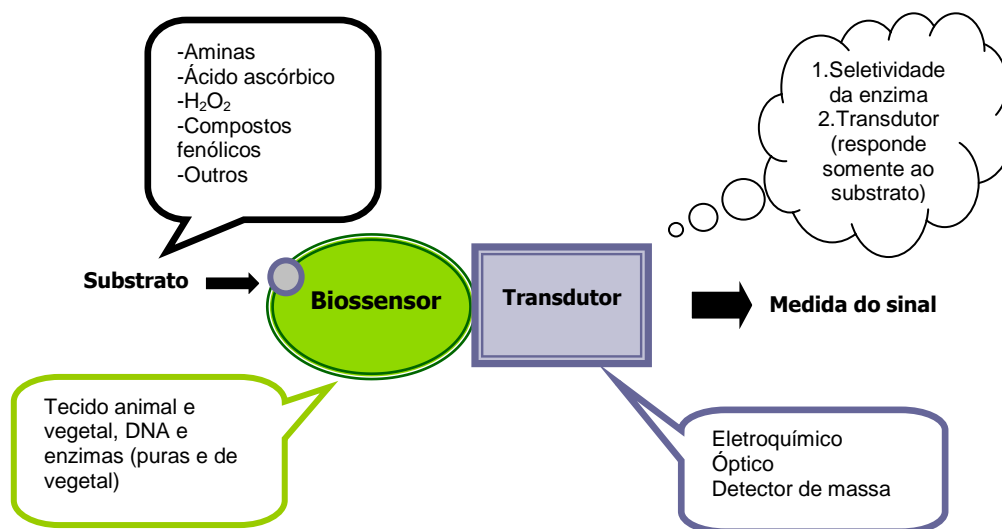


Figura 7. Esquema de um biossensor.

Os biossensores vêm sendo empregados nas áreas biológica, clínica e industrial, como também no monitoramento e controle de alguns poluentes ambientais devido às várias características como: seletividade, baixo custo de

construção, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis^{8,28-30}.

1.8. Ácido cafeico

Os Ácidos fenólicos são largamente distribuídos no reino das plantas e estão presentes em chás, vinhos, frutas e refrigerantes. O ácido cafeico (Figura 8), um derivado do ácido cinâmico é um agente farmacologicamente ativo com propriedade antioxidante, antimutagênica e anticarcinogênica³¹⁻³³. Vários métodos analíticos têm sido propostos para a determinação de ácido cafeico, entre eles, eletroforese capilar³⁴⁻³⁵, análise por injeção sequencial (SIA) usando detecção por espectrofotometria³⁶, cromatografia líquida com coluna isocrática³⁷, extração em fase sólida seguida por separação em cromatografia líquida e detecção no ultravioleta³⁸, assim como os métodos eletroanalíticos³⁹⁻⁴⁰. Os métodos eletroanalíticos vêm sendo aplicados por oferecer melhores características analíticas como alta sensibilidade, ampla faixa linear e tempo de resposta rápida.

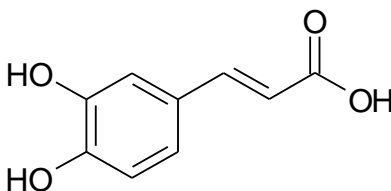


Figura 8. Estrutura química do ácido cafeico.

1.9. Métodos eletroanalíticos

As técnicas eletroanalíticas são amplamente empregadas em estudos de processos de oxidação e redução de várias espécies em diferentes meios, adsorção em superfícies e mecanismo de transferência de elétrons⁴¹.

A voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada, entre outras são exemplos dessas técnicas. O termo “voltametria” é

usado para classificar o grupo de técnicas eletroanalíticas que investiga a relação corrente-potencial aplicada na célula eletroquímica⁴².

Três eletrodos são utilizados no sistema de análise em questão. O eletrodo de trabalho usado para monitorar a resposta do analito. Um segundo eletrodo, geralmente o de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) ou de calomelano saturado são usados como eletrodos de referência que controla o potencial aplicado no eletrodo de trabalho. Há ainda um terceiro eletrodo que completa o circuito carregando a corrente gerada ao eletrodo de trabalho chamado de contra-eletrodo ou eletrodo auxiliar⁴².

Vários métodos voltamétricos foram desenvolvidos e seu tipo varia de acordo com a forma de potencial aplicado, o tipo de eletrodo usado e o estado da solução na célula (com ou sem agitação).

A voltametria cíclica consiste em variar o potencial em uma célula contendo os eletrodos imersos em uma solução sem agitação, onde o sinal de resposta do analito é proporcional a corrente resultante⁴³. A Figura 9 apresenta um sinal de excitação usado na voltametria cíclica onde o potencial é aplicado na forma de uma onda triangular que aumenta até um determinado tempo e decresce linearmente até o potencial inicial (A). Com este sinal se obtém o voltamograma (B) onde se observa a corrente de pico anódico (I_{pa}) e a corrente de pico catódico (I_{pc}), assim como os potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}).

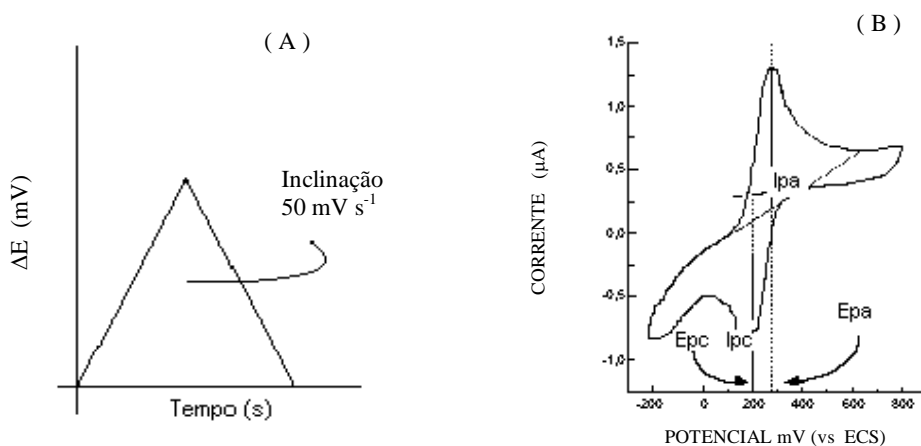


Figura 9. (A) Sinal de excitação em forma de onda triangular linear e (B) voltamograma cíclico.

Em 1969, Ramaley e Krause utilizaram eletrodos estacionários e variaram o potencial na forma de uma onda aliada a uma rampa de potencial na forma de escada, gerando um pico simétrico que poderia ser utilizado com sucesso para determinações analíticas. Essa técnica conhecida como voltametria de onda quadrada é bastante utilizada e possui análise rápida e bastante sensível. Esta técnica vem sendo utilizada não somente para eletrodos sólidos convencionais e de mercúrio como também em eletrodos rotatórios, tubulares, biossensores e ultramicroeletrodos⁴⁰.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Construir biossensores de pasta de carbono contendo enzima peroxidase obtida da vagem (*Phaseolus vulgares*) imobilizada em quitina para a determinação de ácido cafeico em amostras de vinho branco.

2.2. Objetivo Específico

- Selecionar diferentes vegetais para a extração da enzima peroxidase.
- Determinar a atividade, proteína total e atividade específica do homogenato, fonte da enzima peroxidase.
- Obter quitina dos gládios de lulas selecionados na região do litoral catarinense.
- Comparar os espectros de infravermelho da quitina obtida dos gládios de lulas e da quitina pura.
- Reticular o biopolímero quitina com glutaraldeído e epicloridrina.
- Imobilizar a peroxidase na quitina reticulada.
- Construir e otimizar os biossensores de pasta de carbono contendo peroxidase imobilizada em quitina.
- Aplicar os biossensores na determinação de ácido cafeico em amostras de vinho branco.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipamentos

Os vegetais usados na obtenção do extrato enzimático (homogenato) contendo a enzima peroxidase foram homogeneizados em um liquidificador *Black & Decker* modelo IB 900 e filtrados em funil com camadas de gaze.

Para a centrifugação do extrato foi utilizada uma centrífuga Hitache High Miniature modelo CF15D.

Um espectrofotômetro 724 digital UV-vis e cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho ótico foram usados na obtenção das medidas de absorbância para a determinação de proteína total e atividade do extrato enzimático.

Espectrofotômetro infravermelho FT Perkin Elmer – modelo 16 PC foi utilizado para a análise de amostra de quitina pura e obtida dos gládios de lulas.

Para a trituração dos gládios de lula foi utilizado um moinho analysenmühle A10 da Junke & Kundel IKA Labortechnik.

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato-galvanostato da Autolab PGSTAT12 (Eco Chemie, Suécia). Todas as medidas utilizaram uma célula de vidro, com tampa de PVC sem compartimento divisório e com capacidade de 15 mL. Os três eletrodos empregados foram o biossensor construído em nosso laboratório que foi utilizado como eletrodo de trabalho, o eletrodo de platina usado como eletrodo auxiliar e o eletrodo Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl) como eletrodo de referência.

3.2. Reagentes e soluções

Para a determinação da peroxidase foi preparada uma solução de guaiacol 0,05 mol L⁻¹ (Aldrich) onde 0,6 mL deste reagente foi diluído em um balão volumétrico de 100 mL com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7).

Solução de peróxido de hidrogênio 1,0x10⁻³ mol L⁻¹ foi preparada utilizando 1,0 mL desse reagente (Vetec) em um balão volumétrico de 100 mL com tampão

fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7). Desta solução foi retirado 1,0 mL e novamente diluído em um balão volumétrico de 100 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7).

Solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) foi preparada a partir do reagente fosfato de potássio monobásico (Vetec) e potássio fosfato dibásico (Química Moderna).

Soluções de epicloridrina (Sigma) e glutaraldeído (Sigma) foram usadas para reticulação da quitina.

Solução de ácido cafeico (Sigma) $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diariamente em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7). As soluções de $2,0 \times 10^{-5}$ a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas a partir da solução estoque por diluição em solução tampão.

O biossensor de pasta de carbono foi preparado usando pó de grafite (Acheson 38, Fisher Scientific), óleo mineral da Aldrich e a enzima peroxidase obtida da vagem.

A quitina foi obtida da Sigma e dos gládios de lula do litoral de Porto Belo em Santa Catarina e usados como suporte para imobilização da peroxidase.

O extrato de vagem (*Phaseolus vulgaris*) foi usado como fonte de peroxidase. Este vegetal foi obtido em mercado local de Florianópolis, lavado, descascado, triturado em um liqüidificador, centrifugado e estocado a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Obtenção da enzima peroxidase

Os vegetais selecionados como fonte de enzima foram adquiridos no mercado local de Florianópolis. Após lavagem do vegetal, uma massa de 25,0 g foi homogeneizada em um liqüidificador contendo 100 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7). Em seguida, o extrato enzimático foi filtrado em quatro camadas de gazes e centrifugado a $28000 \times g$ (18000 rpm) durante 5 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O

sobrenadante foi dividido em diversas alíquotas, armazenado em refrigerador a 4 °C e utilizado como fonte da enzima peroxidase.

4.2. Determinação da atividade, proteína total e atividade específica da peroxidase

A atividade da peroxidase obtida dos vegetais foi determinada pela medida da absorbância em 470 nm durante 2 min, do tetraguaiacol formado após a reação entre 0,2 mL da solução sobrenadante (fonte da enzima), 2,7 mL de solução de guaiacol $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e 0,1 mL de solução de peróxido de hidrogênio $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7), a 25 °C.

Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto nas condições mencionadas acima^{2,44}.

O método de Biureto foi utilizado para a determinação de proteína total da solução sobrenadante. O método utiliza albumina de soro bovino como padrão e o produto da reação absorve na região de 540 nm⁴⁵.

A razão entre a atividade enzimática (U/mL) e a proteína total (mg/mL) fornece a atividade específica (U/mg).

4.3. Obtenção da quitina dos gládios de lula

Os gládios, fonte da quitina foram obtidos de lulas da região de Santa Catarina. Após a seleção e coleta das lulas, os gládios foram retirados, lavados várias vezes com água corrente e secos em temperatura ambiente. Em seguida, foram moídos, peneirados selecionando-se partículas com granulometria de 70 μm (mesh) e estocados a temperatura ambiente para serem utilizados como suporte sólido para a imobilização da enzima peroxidase.

4.4. Infravermelho da quitina

Os espectros de infravermelho foram obtidos misturando partículas (pó) de quitina pura (Sigma) e obtida dos gládios de lula em KBr. A mistura foi prensada até obter uma pastilha fina e colocada em um compartimento de amostras no espectrômetro⁴⁶.

4.5. Reticulação da quitina com epicloridrina e glutaraldeído

A quitina obtida dos gládios de lula foi usada como suporte sólido para a imobilização da enzima peroxidase obtida da vagem após ser quimicamente reticulada com glutaraldeído e epicloridrina.

Inicialmente, uma alíquota de 2,5 mL da solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) preparada em água deionizada foi transferido para uma massa de 0,1 g de pó de quitina, onde foi mecanicamente agitada por 30 min em temperatura ambiente, e após este tempo de reação, lavada com água destilada para a remoção do excesso do glutaraldeído.

Em seguida, uma alíquota de 30,0 mL da solução de epicloridrina $3,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foi adicionada à quitina, aquecida a 50 °C por 1 h e após este tempo 7,0 mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ foi adicionada e mantida em aquecimento por mais 1h. O pó de quitina foi lavado com água, solução de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ e solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹, respectivamente para remover o excesso de epicloridrina. Finalmente, a quitina foi lavada com água destilada e solução tampão fosfato (pH 7) para remover o excesso dos reagentes reticulantes e seca a temperatura ambiente.

4.6. Imobilização da peroxidase em matriz de quitina

Alíquotas de 330 a 1500 µL do homogenato de vagem (fonte de peroxidase) contendo 500 a 2200 Unidades/ mL de peroxidase foram adicionadas em 0,10 g de quitina previamente reticulada, de acordo com as condições

descritas acima, e agitadas por 2 h a 25 °C. A quitina contendo a enzima imobilizada foi lavada com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7) para remover o excesso de enzima, seco a temperatura ambiente e o sólido usado para a construção do biossensor.

4.7. Preparação do Biossensor

Inicialmente, 50,0 mg de quitina previamente reticulada contendo 1200 Unidades/ mL de peroxidase (10 % m/m) foi misturada com 375 mg de pó de grafite (75 % m/m) em um almofariz por 20 min para assegurar a dispersão uniforme da enzima. Subseqüentemente, 75,0 mg de Nujol (15 % m/m) foi adicionada e misturada por mais 20 min para produzir a pasta de carbono. A pasta modificada foi transferida para uma seringa de 1 mL e um fio de cobre foi inserido para obtenção do contato elétrico e usado como eletrodo de trabalho. O biossensor foi armazenado em temperatura ambiente quando não estava em uso.

4.8. Medidas eletroanalíticas

As medidas de voltametria cíclica foram registradas ciclando o potencial entre + 0,45 a - 0,25 V em uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Todos os potenciais foram medidos com o biossensor proposto vs o eletrodo de Ag/AgCl (3 mol L⁻¹ KCl), após um tempo de agitação necessário de 60 s em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7).

As medidas de voltametria de onda quadrada foram realizadas aplicando um potencial de varredura entre + 0,45 a - 0,25 V, com uma amplitude de potencial variando de 10 a 150 mV e uma freqüência de 10 a 150 Hz. Todos os potenciais foram medidos com o biossensor proposto vs o eletrodo de Ag/AgCl (3 mol L⁻¹ KCl), após um tempo de agitação necessário de 60 s em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7).

O método de adição múltipla de padrão foi usado para a determinação de ácido cafeico em amostras de vinho branco. Uma alíquota de 5,0 mL de vinho em

5,0 mL solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) contendo peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi analisado após sucessivas adições de $8,0 \times 10^{-5}$; $1,2 \times 10^{-4}$ e $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ da solução padrão de ácido cafeico. Após cada adição, os voltamogramas de onda quadrada foram registrados no intervalo de potencial de + 0,45 a - 0,25 V, em uma amplitude de potencial de 50 mV e uma frequência de 80 Hz. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

5. RESULTADOS E DISCUSSAO

5.1. Enzimas obtidas de diferentes tecidos vegetais

Diversos vegetais como nabo branco (*Brassica campestris*), berinjela (*Solanum melogena*), abóbora (*Cucurbita pepo*), batata doce (*Ipamoea batatas L. Lam*), vagem (*Phaseolus vulgaris*), nabo amarelo (*Brassica rapa*), cará (*Dioscorea alata L.*) e milho verde (*Zea mays*), foram selecionados e a enzima peroxidase foi obtida. Após a obtenção do extrato enzimático foi determinado a atividade (U/mL), proteína total (mg/mL) e atividade específica (U/mg) usando medidas no comprimento de onda máximo do produto formado e substrato específico (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade enzimática da peroxidase obtida de vegetais.

Vegetal	Atividade enzimática (U/mL)	Proteína Total (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Nabo amarelo	1.156,2	9,56	120,9
Berinjela	984,8	6,46	152,4
Batata doce	2.197,0	6,84	321,2
Nabo branco	2.409,1	4,50	535,4
Milho verde	5.437,5	9,05	600,8
Abóbora	3.515,2	5,29	664,5
Cará	9.287,9	10,92	850,5
Vagem	6.484,8	4,88	1.328,8

A maior atividade específica da peroxidase foi encontrada em tecido de vagem, ao contrário do nabo amarelo e berinjela que obtiveram a menor atividade. Vale ressaltar que a atividade dessa enzima em tecidos vegetais depende de vários fatores, entre eles o local do plantio, período, espécie e do estado de amadurecimento, sendo menor em frutas ou vegetais não-amadurecidos².

Para o desenvolvimento desse trabalho foi selecionada a vagem como fonte da peroxidase para posterior imobilização em quitina e construção de biossensores por apresentar maior atividade específica e não haver nenhum relato na literatura quanto à fonte dessa enzima e nem construção de biossensores.

5.2. Reação Enzimática

A peroxidase na presença de guaiacol e peróxido de hidrogênio catalisa a reação levando a formação do tetraguaiacol que absorve em comprimento de onda máximo de 470 nm (Figura 10). Essa reação foi usada nas medidas espectrofotométricas dessa enzima para determinar o teor da atividade e para avaliar o melhor pH, inibidores e substratos².

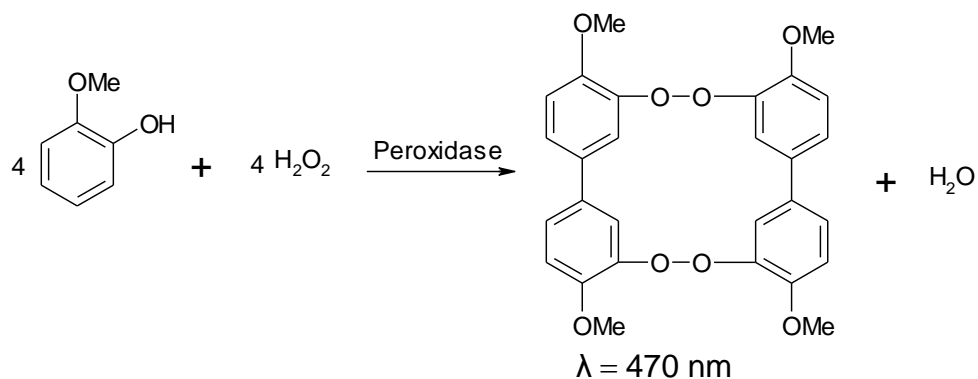


Figura 10. Reação enzimática da peroxidase.

5.3. Estudo do pH

O pH exerce grande influência sobre as reações enzimáticas. As enzimas possuem um pH ótimo onde a atividade e a velocidade das reações é máxima. Sendo assim, estudo-se o efeito do pH de 5 a 8 do extrato enzimático sobre a absorbância formada do produto da reação da peroxidase, guaiacol e peróxido de hidrogênio. A maior resposta espectrofotométrica foi verificada em pH 7 decrescendo em pH inferiores e superiores como mostra a Figura 11. Conseqüentemente, os estudos posteriores foram realizados em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7).

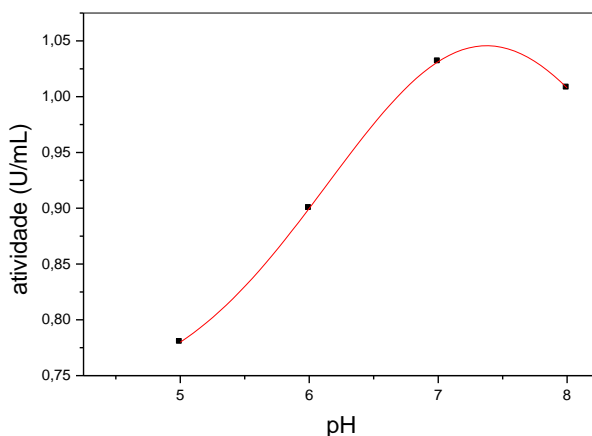


Figura 11. Efeito do pH (5 a 8) sobre a resposta espectrofotométrica da peroxidase com guaiacol e peróxido de hidrogênio.

5.4. Estudo de inibidores

Inibidores são substâncias que tem a capacidade de combinar com a enzima impedindo total ou parcialmente a reação do substrato com a enzima, diminuindo desta maneira a velocidade da reação enzimática.

Estudou-se o efeito das substâncias: sulfito, cisteína, dietilditiocarbamato e ácido ascórbico como possíveis inibidores da enzima peroxidase. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para a concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ e $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$

¹ dessas substâncias contendo guaiacol $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) e compara a porcentagem de inibição. Como pode ser observado o ácido ascórbico proporcionou uma maior inibição e o dimetilditiocarbamato a menor. Segundo a literatura, a adição do sulfito inibe várias enzimas que possuem como sítio ativo ferro, cobre, zinco e molibdênio⁴⁷. *Benjakul et al.* estudaram o processo de inibição da cisteína com a enzima fenoxidase. Nessa determinação, foi observado que o valor de K_m (constante de Michaelis-Menten) aumentou com a concentração de cisteína enquanto o valor da velocidade máxima (V_m) permaneceu inalterada⁴⁸.

Tabela 3: Estudo de inibição da peroxidase na presença de diferentes substâncias.

Substâncias	Inibição (%)
Guaiacol	0,0
Sulfito (10^{-2})	93,3
Sulfito (10^{-3})	88,2
Cisteína (10^{-2})	79,0
Cisteína (10^{-3})	74,3
Dietilditiocarbamato (10^{-2})	65,1
Dietilditiocarbamato (10^{-3})	60,5
Ácido Ascórbico (10^{-2})	97,0
Ácido Ascórbico (10^{-3})	99,0

5.5. Estudo do substrato

Para o estudo dos substratos foram selecionados o guaiacol e o catecol. O tetraguaiacol foi monitorado em 470 nm formado a partir da reação do guaiacol, peróxido de hidrogênio e peroxidase (Figura 10). A reação utilizando o catecol, peróxido de hidrogênio e peroxidase foi monitorada em comprimento de onda de 420 nm da o-quinona formada (Figura 12).

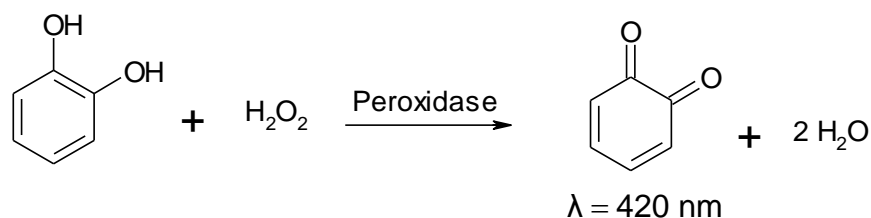


Figura 12. Reação do catecol à o-quinona.

Os valores das atividades da peroxidase nesses substratos estão apresentados na Tabela 4. Como pode ser observada essa enzima apresenta maior atividade em guaiacol.

Tabela 4: Atividade da peroxidase em guaiacol e catecol.

Substrato	Atividade (U/mL)	%
Guaiacol	0,8452	100
Catecol	0,3880	46

5.6. Determinação do grau de acetilação e desacetilação da quitina

O grau de acetilação (% de grupos aminos) de quitina pura (a) e quitina de gládios de lula (b) foi determinado usando a espectroscopia no infravermelho. A Figura 13 mostra os espectros obtidos e como pode ser observada, a absorção na região entre 1155 a 1032 no espectro da quitina de lula e 1158 a 1023 na quitina pura são resultados do estiramento vibracional C-O de álcoois primários. A deformação N-H origina uma banda em 1548 e 1558 para a quitina pura e quitina de lula, respectivamente. Duas bandas de absorção podem ser encontradas em aproximadamente 1655 e 1625 cm^{-1} , característica do estiramento C=O de amidas.

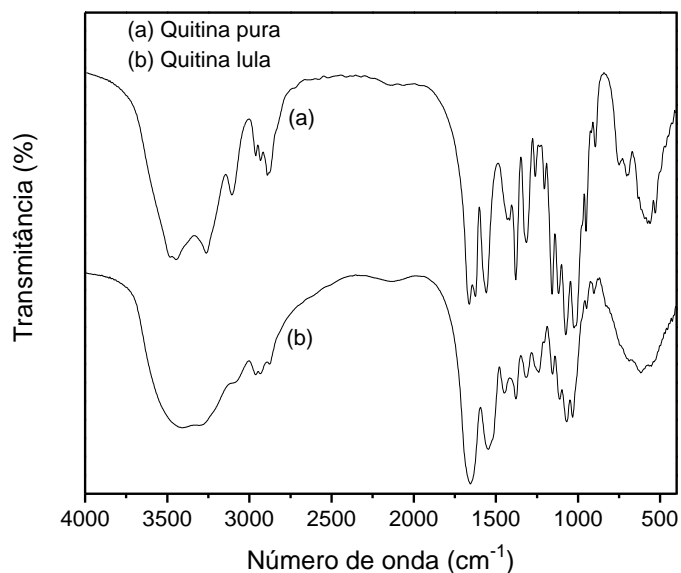


Figura 13. Espectros de infravermelho da (a) quitina pura e (b) quitina de gládios de lula.

Existem pelo menos três relações de bandas no infravermelho que servem para determinar a concentração de grupos N-acetil: A_{1655}/A_{3450} , A_{1550}/A_{2878} , e A_{1655}/A_{2867} , porém a relação A_{1655}/A_{3450} possui vantagens sobre as outras, pois sua banda de absorção é bem visível e isolada. O método de linha base^{20,23} foi utilizado e o grau de acetilação e desacetilação da quitina foram determinados pelas equações abaixo, onde se utiliza a razão das absorbâncias 1655 cm^{-1} e 3450 cm^{-1} .

$$\% \text{ N-acetil} = (A_{1655}/A_{3450}) \times 100 \quad (3)$$

$$\% \text{ desacetilação} = (1 - (A_{1655}/A_{3450}) \times (1 / 1,33)) \times 100 \quad (4)$$

A partir das equações 3 e 4 a porcentagem de acetilação é de 86% para a quitina pura e 91,6% para a quitina de gládios de lula. O grau de desacetilação para a quitina pura e para a quitina obtida dos gládios de lula foi de 14% e 8,4%, respectivamente. Devido à baixa solubilidade da quitina a espectroscopia de IV foi selecionada para essa quantificação, além disso, essa técnica possui a vantagem de ser rápida, simples e eficiente.

O espectro de infravermelho da quitina obtida da Sigma foi selecionada para comparação daquela obtida dos gládios de lula. No entanto, para

imobilização da peroxidase e construção dos biossensores, foi selecionada quitina obtida dos gládios de lula por não haver nenhum relatado na literatura.

5.7. Reticulação da quitina e imobilização da peroxidase

A propriedade da enzima imobilizada é governada geralmente pela propriedade tanto da enzima como do suporte empregado. A quitina (Figura 6) é composta por uma longa cadeia linear polimérica e a presença do grupo acetamino e hidroxila livre em cada unidade C_6 fazem desse biopolímero uma matriz promissora para imobilização da enzima.

A Figura 14 apresenta uma sugestão da reação entre (a) quitina (QTN) usada como suporte e os reticulantes (b) glutaraldeído e (c) epicloridrina e subsequentemente a imobilização da (d) peroxidase. Inicialmente, o glutaraldeído foi usado para a ativação dos possíveis grupos amino (8,4%). Este reagente induz a formação da base de Schiff entre o reagente dos grupos aldeídos e as moléculas de enzimas. A adição da epicloridrina causa a ruptura do anel epóxido ligado através do átomo de carbono removendo o átomo de cloro. A peroxidase imobilizada em quitina previamente reticulada com glutaraldeído/epicloridrina (e) apresentou forte interação, alta sensibilidade e estabilidade.

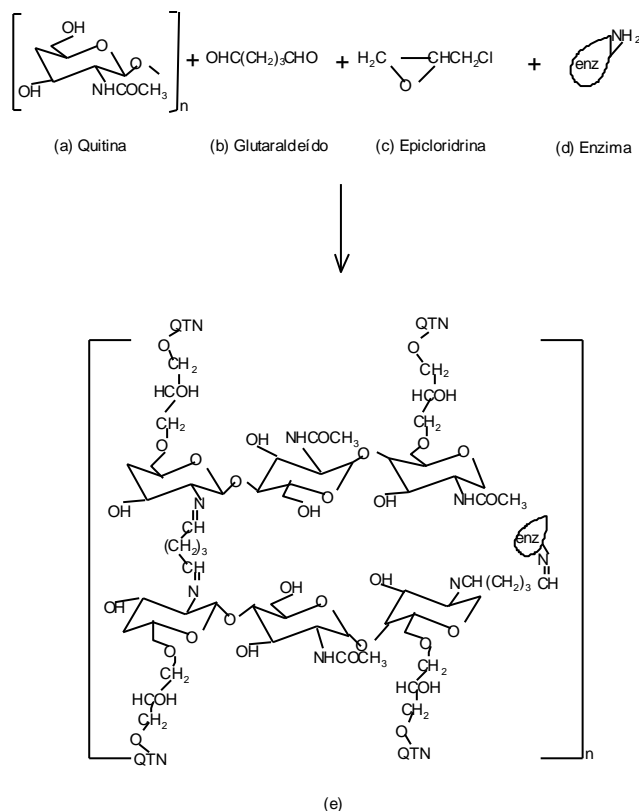


Figura 14. Reação entre quitina (a), glutaraldeído (b), epicloridrina (c), enzima (d) e o produto formado (e).

5.8. Processo enzimático

O potencial de redução eletroquímica da quinona no processo enzimático foi investigado usando a voltametria cíclica. A peroxidase catalisa a oxidação do ácido cafeico a o-quinona na presença do peróxido de hidrogênio e posteriormente a o-quinona é reduzida eletroquimicamente na superfície do biossensor proposto em potencial de + 0,10 V. A Figura 15 ilustra esse processo enzimático.

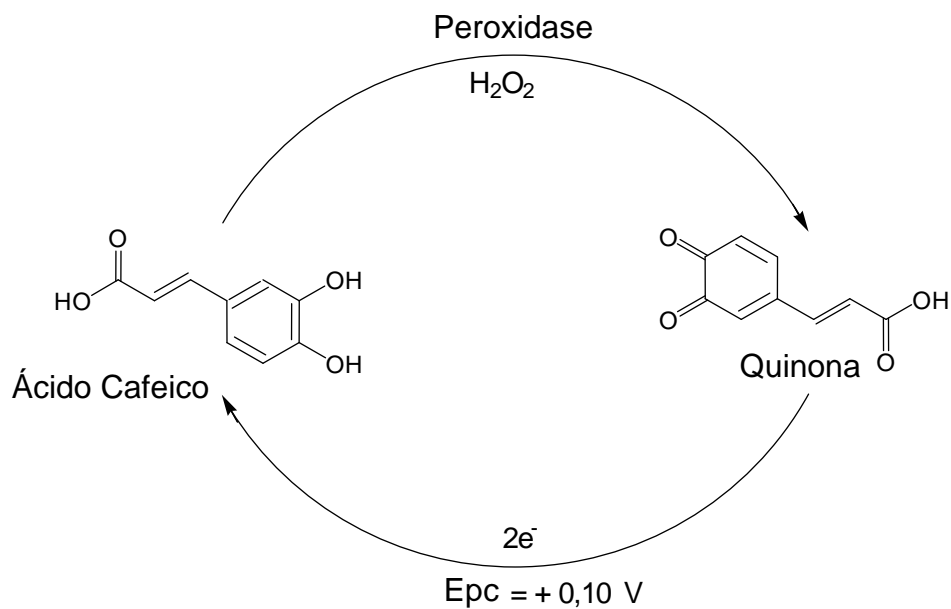


Figura 15. Esquema do processo enzimático entre ácido cafeico, peróxido de hidrogênio e peroxidase.

5.9. Voltametria cíclica

Usando esse processo enzimático, a Figura 16 mostra as medidas de voltametria cíclica realizadas em uma faixa de potencial de + 0,45 a – 0,25 V vs eletrodo de Ag/AgCl e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) contendo peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e concentrações de $4,0 \times 10^{-5}$, $8,0 \times 10^{-5}$, $1,2 \times 10^{-4}$ e $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cafeico usando o biossensor contendo peroxidase imobilizada em matriz de quitina.

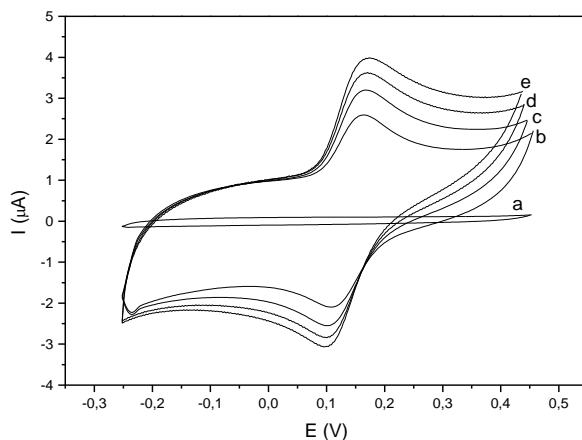


Figura 16. Voltamogramas cíclicos obtidos usando o biossensor proposto em solução tampão fosfato (pH 7) para: (a) peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e ácido cafeico (b) $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $8,0 \times 10^{-5}$, (d) $1,2 \times 10^{-4}$ (e) $1,6 \times 10^{-4}$ e solução de peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

5.10. Otimização e desempenho do biossensor

Para avaliar o desempenho do biossensor proposto vários parâmetros foram investigados utilizando a voltametria de onda quadrada, entre eles a concentração da enzima peroxidase (500 a 2200 unidades/ mL), pH (5 a 8), frequência (10 a 150 Hz), amplitude de potencial (10 a 150 mV) e o potencial de pico catódico (+ 0,45 a - 0,25 V).

Para a construção dos biossensores foi realizado um estudo de unidades de enzima imobilizada na quitina previamente reticulada. Os biossensores foram construídos contendo 500, 800, 1200, 1600 e 2200 unidades/ mL de peroxidase, onde a concentração de 1200 unidades/ mL da enzima foi selecionada para o desenvolvimento desse trabalho devido a obtenção da maior intensidade de corrente do pico catódico.

O estudo da composição do biossensor foi previamente estudado em nosso grupo. A melhor proporção foi obtida para o biossensor contendo 75:15:10 (% m/m) de grafite:nujol:quitina reticulada contendo a peroxidase imobilizada.

Estudo da variação do pH de 5 a 8 foi investigado. A maior resposta do biossensor foi obtida em pH 7 e utilizada nos estudos posteriores. Esse valor de pH é semelhante ao encontrado por vários pesquisadores quando utilizaram biossensores contendo a peroxidase purificada⁴⁹⁻⁵¹.

A amplitude de potencial foi investigada no intervalo de 10 a 150 mV utilizando solução de ácido cafeico $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e solução de peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. A intensidade do pico catódico (I_{pc}) foi maior para a amplitude de potencial de 50 mV e utilizado nos estudos subsequentes.

Do mesmo modo, foi investigada a frequência em intervalo de 10 a 150 Hz contendo solução de ácido cafeico $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e solução de peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Foi obtida maior corrente em frequência de 80 Hz sendo esta utilizada para os demais estudos.

Realizou-se a varredura de potencial de + 0,45 a - 0,25 V vs o eletrodo de Ag/AgCl onde foi determinado o potencial de redução do ácido cafeico em + 0,10 V.

A Tabela 5 resume os parâmetros analíticos investigados e os melhores valores encontrados na otimização do biossensor.

Tabela 5: Parâmetros de otimização do biossensor.

Parâmetros	Faixa investigada	Melhor resposta
Concentração enzimática*	500 – 2200	1200
pH	5,0 – 8,0	7,0
Frequência (Hz)	10 – 150	80
Amplitude (mV)	10 – 150	50
E_{pc} (V)	+ 0,45 a - 0,25	+ 0,10

* unidades/ mL de peroxidase

5.11. Estabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade

A estabilidade operacional é considerada um dos fatores essenciais na performance do biossensor. Assim, o biossensor foi testado por medidas

repetitivas sem a renovação da superfície por um período de 300 dias. Quando o biossensor foi armazenado em temperatura ambiente e testado de 30-30 dias, foi observado após 150 dias um decréscimo de resposta de somente 20 % (Figura 17). Esse estudo foi realizado empregando solução de ácido cafeico $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e solução peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Esta longa estabilidade pode estar atribuída ao fato da forte interação entre a peroxidase que está imobilizada em matriz de quitina quimicamente reticulada.

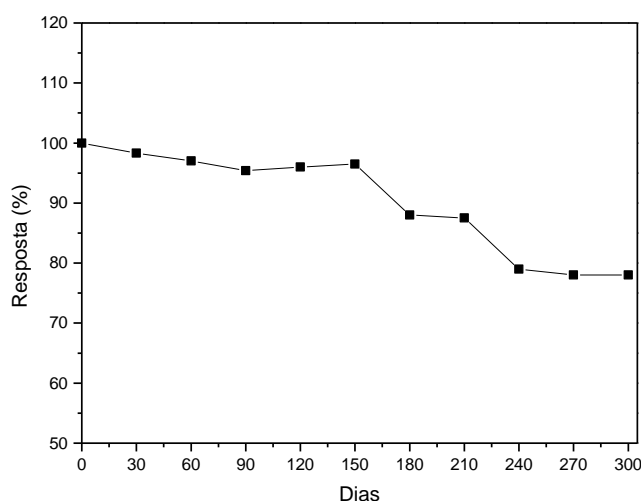


Figura 17. Estudo da estabilidade do biossensor contendo solução de ácido cafeico $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e solução peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7.

O estudo da repetibilidade foi realizado a partir de dez medidas sucessivas do biossensor em soluções contendo $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cafeico e solução $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. Os valores obtidos de correntes de pico catódico foram calculados e o desvio padrão relativo encontrado foi de 4 %.

A reprodutibilidade da resposta de corrente catódica de seis biossensores foi investigada em solução contendo $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cafeico e $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. O desvio padrão relativo entre esses dados foi de 13%.

5.12. Curva analítica

Após otimização do biossensor a curva analítica de ácido cafeico foi obtida utilizando a voltametria de onda quadrada. Como mostra a Figura 18 foi obtida uma linearidade de $2,0 \times 10^{-5}$ a $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($i_{pc} = 4,863 + 4,106 \times 10^5$ [ácido cafeico] $r=0.9990$). O i_{pc} é a corrente de pico catódico (μA) e [ácido cafeico] a concentração de ácido cafeico (mol L⁻¹) com um limite de detecção de $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

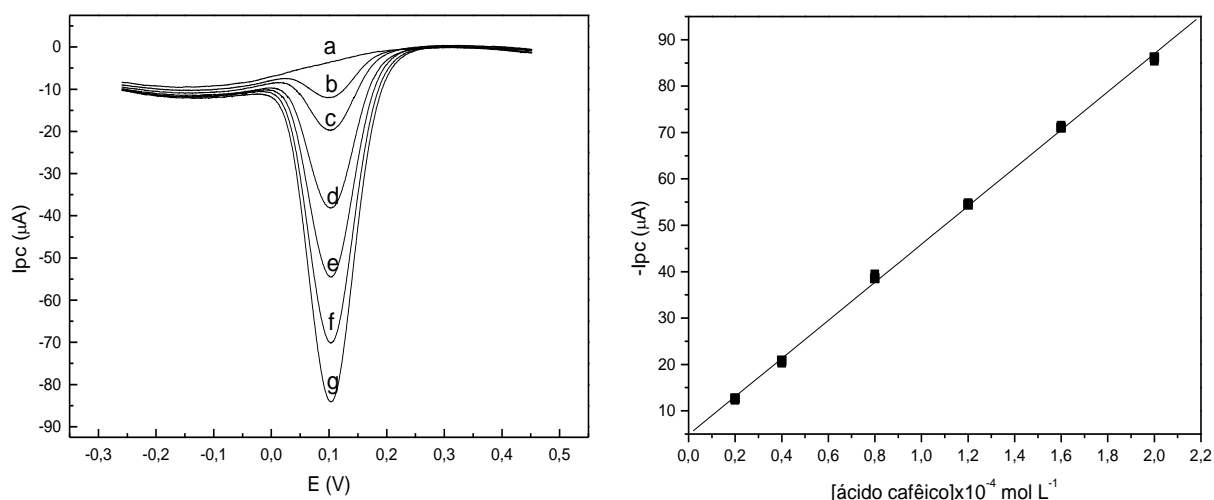


Figura 18. Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica obtida usando o biossensor contendo (a) solução tampão fosfato e solução peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e adição de ácido cafeico de (b) $2,0 \times 10^{-5}$ (c) $4,0 \times 10^{-5}$; (d) $8,0 \times 10^{-5}$; (e) $1,2 \times 10^{-4}$; (f) $1,6 \times 10^{-4}$; (g) $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em 50 mV de amplitude e frequência de 80 Hz.

5.13. Estudo de adição e recuperação e determinação de ácido cafeico em vinho branco

O estudo de adição e recuperação (Tabela 6) de ácido cafeico em quatro amostras de vinho branco foi realizado usando o biossensor proposto. Neste estudo, três diferentes concentrações (14,41, 21,62 e 28,82 mg L⁻¹) foram

adicionadas nas amostras de vinho. O ácido cafeico recuperado variou de 90,7 a 105,0 %, evidenciando que não há interferência da matriz na metodologia proposta.

Tabela 6: Estudo de adição e recuperação de ácido cafeico em vinho branco.

Amostra	Ácido Cafeico (mg L ⁻¹)		
	Adicionado	Recuperado	Recuperação (%)
A	14,41	14,02	97,3
	21,62	22,16	102,5
	28,82	28,64	99,4
B	14,41	13,69	95,0
	21,62	21,62	100,0
	28,82	29,18	101,2
C	14,41	13,26	92,0
	21,62	19,62	90,7
	28,82	30,27	105,0
D	14,41	15,13	105,0
	21,62	22,43	103,7
	28,82	28,10	97,5

O biosensor proposto foi usado para a determinação de ácido cafeico (mg L⁻¹) em quatro amostras de vinhos. O teor encontrado dessa substância nessas amostras foi de A=3,63±0,02, B=3,13±0,04, C=2,85±0,02 e D=3,69±0,04 mg L⁻¹. Não há relatado na literatura método oficial para determinação de ácido cafeico. No entanto, foram consultados alguns trabalhos publicados e comparados os resultados obtidos usando o método proposto. Vale ressaltar que essa comparação pode ser comprometida uma vez a quantidade dessa substância presente em vinhos pode variar de acordo com a marca, região entre outros fatores.

6. CONCLUSÃO

O Brasil possui uma rica biodiversidade. Dentre essa grande biodiversidade, encontra-se vegetais fonte de várias enzimas que podem ser obtidas e empregadas com sucesso na construção de biossensores. A peroxidase foi facilmente obtida dos vegetais e apresentou maior atividade específica no homogenato de vagem (*Phaseolus vulgaris*) sendo esta utilizada como fonte da enzima peroxidase. Os gládios de lulas obtidos do litoral catarinense foram caracterizados por infra-vermelho e comparados com o espectro de quitina comercial (Sigma). Os dois espectros apresentaram bandas nas mesmas regiões caracterizando os gládios obtidos das lulas como fonte de quitina pura. A porcentagem de grupo acetamida obtido para a quitina dos gládios de lulas foi de 91,6 %. A reticulação da quitina dos gládios foi simples e eficiente garantindo a estabilidade da enzima peroxidase imobilizada neste suporte. A construção do biossensor foi bastante viável devido ao baixo custo dos materiais utilizados. O biossensor proposto apresentou uma metodologia analítica simples, sensível e adequado para determinação de ácido cafeico em vinho branco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2002.
2. FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecido e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Quím. Nova**, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.
3. VOET, D.; VOET, J. G.; **Biochemistry**, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1995.
4. DE JESUS, P. C. Enzimas imobilizadas em crisotila e organogel: aplicação na resolução de ácidos racêmicos. Dissertação (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1998.
5. BIRCH, G. G.; BLAKEBROUGH, N.; PARKER, K. J. **Enzymes and Food Processing**. London: Applied science publishers, 1981.
6. QUEIROZ, N. Aplicações sintéticas de enzimas imobilizadas em organo – gel e gel de Agar. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1997.
7. BLOOMFIELD, M. M.; STEPHENS, L. J. **Chemistry and the living organism**. 6th ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1996.
8. FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Quím. Nova**, v. 15, n. 1, p. 28-39, 1992.
9. LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1986.
10. FOX, P. F. **Food Enzymology**, Londres: . 1 v.
11. VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (Cucurbita pepo). **Quim. Nova**, n. 26, v. 1, p. 39-43, 2003.
12. SOYSAL, Ç.; SÖYLEMEZ, Z. Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. **J. Food Eng.**, v. 68, n. 3, p. 349-356, 2005.
13. SONG, H.; YAO, J.; LIU, J.; ZHOU, S.; XIONG, Y.; JI, L. Effects of phtalyc anhydride modification on horseradish peroxidase stability and structure. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 36, n. , p. 605- , 2005.
14. <http://bill.srn.arizona.edu/gifs/pocrop.gif> (acessado em 04/05/06).

15. KRAJEWSKA B. Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilization: a review. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.
16. DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas. **Quím. Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
17. KIMURA, I.Y. Remoção de corantes reativos contendo grupos vinilsulfona e triazina por adsorção e coagulação/floculação com quitosana. Dissertação (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2001.
18. JUANG, R.; WU, F.; TSENG, R. Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilization. **Adv. Environ. Res.**, v. 6, n. 2, p.171-177, 2002.
19. LONGHINOTTI, E. Adsorção dos corantes azul de metileno, alaranjado G, alaranjado IV e alaranjado de xileno pelo biopolímero quitina. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1996.
20. MOECKE, E.H.S. Copolimerização e enxerto de monômeros vinílicos sobre quitina e quitosana iniciada por cério (IV) – Aplicações na tecnologia de papel. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1990.
21. CHANDUMPAI, A.; SINGHPUBULPORN, N.; FAROONGSARNG, D.; SORNPRASIT, P. Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lissoniana* and *Loligo formosana*. **Carbohydr. Polym.**, v. 58, n. 4, p. 467- 474, 2004.
22. MAJETI, N. V.; KUMAR, R. A review of chitin and chitosan applications. **React. Funct. Polym.**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.
23. GEORGE, A. F.; ROBERT, S. **Chitin Chemistry**. The McMillan Press, 1992.
24. JIANG, X.; CHEN, L.; ZHONG, W. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. **Carbohydr. Polym.**, v. 54, n. 4, p. 457-463, 2003.
25. LAVERTU, M.; XIA, Z.; SERREQUI, A. N.; BERRADA, M.; RODRIGUES, A.; WANG, D.; JUSCHMANN, M. D.; GUPTA, A. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 32, n. 3, p. 1149-1158, 2003.
26. SHIGEMASA, Y.; MATSUURA, H.; SASHIWA, H.; SAIMOTO, H. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree

- of deacetylation in chitin. **Int. J. Biol. Macromolecules**, v. 18, n. 3, p. 237-242, 1996.
27. ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Quím. Nova**, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002.
28. RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Quím. Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320, 2002.
29. OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Immobilization procedures for the development of a biosensor for determination of hydroquinone using chitosan and gilo (*Solanum gilo*). **Enzyme Microb. Technol.**, v. 38, n. 3-4, p. 449-456, 2006.
30. FREIRE, R. S.; DURAN, N.; KUBOTA, L. T. Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 13, n. 2, p. 456-462, 2002.
31. ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids A review. **Analyst**, v. 122, n. 2, p. 11R-34R, 1997.
32. ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, v. 125, n. 5, p. 989-1009, 2000.
33. GIACOMELLI, C.; CKLESS, K.; GALATO, D.; MIRANDA, F.S.; SPINELLI, A. Electrochemistry of caffeic acid aqueous solutions with pH 2.0 to 8.5. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 13, n. 3, p. 332-338, 2002.
34. ARCE, L.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system. **J. Chromatogr. A**, v. 827, n. 1, p. 113-120, 1998.
35. WANG, A.; ZHOU, Y.; WU, F.; HE, P.; FANG, Y. Determination of active ingredients in Huangdan Yinchen Keli by CZE with amperometric detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 35, n. 4, p. 959-964, 2004.
36. PINTO, P. C. A. G.; SARAIVA, M. L. M. F. S.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Automatic sequential determination of the hydrogen peroxide scavenging activity and evaluation of the antioxidant potential by the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay in wines by sequential injection analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 532, n. 1, p. 25-32, 2005.
37. AMAKURA, Y.; OKADA, M.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 891, n. 1, p. 183-188, 2000.

38. GARCÍA, A. A.; GRANDE, B. C.; GÁNDARA, J. S. Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. **J. Chromatogr. A**, v. 1054, n. 1-2, p. 175-180, 2004.
39. SOUSA, W. R.; ROCHA, C.; CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; ZANONI, M. V. B. Determination of the relative contribution of phenolics antioxidants in orange juice by voltammetric methods. **J. Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 5, p. 619-633, 2004.
40. JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 35, n. 2-3, p. 238-241, 2004.
41. SOUZA, D.; MACHADO S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos, **Quím. Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.
42. GÜNZLER, H.; WILLIAMS, A. **Handbook of analytical techniques**. Weinheim: Wiley – VHC, 2001. 2 v.
43. SAWYER, D. T.; HEINEMAN, W. R.; BEEBE, J. M. **Chemistry experiments for instrumental methods**. New York: John Wiley & Sons, 1984.
44. ZHANG, Z.; PANG, X.; XUEWU, D.; JI, Z.; JIANG, Y. Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. **Food Chem.**, v. 90, n. 1-2, p. 47-52, 2005.
45. ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quím. Nova**, v. 21, n. 6, p. 787- 793, 1998.
46. NYQUIST, R. A.; **Interpreting Infrared, Raman, and Nuclear Magnetic Resonance Spectra**. San Diego: Academic Press, 2001. 1 v.
47. WHITAKER, J. R.; **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. New York: Marcel Dekker Inc.,
48. BENJAKUL, S.; VESESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Inhibitory effect of cysteine and glutathione on phenoloxidase from kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). **Food Chem.**, v. 98, n. , p. 158-163, 2006.
49. JIA, J.; WANG, B.; WU, A.; CHENG, G.; LI, Z.; DONG, S. A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network. **Anal. Chem.**, v. 74, n. 9, p. 2217-2223, 2002.

50. MIAO, Y.; TAN, S. N. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of peroxidase in chitosan matrix crosslinked with glutaraldehyde. **Analyst**, v. 125, n. 9, p. 1591-1594, 2000.
51. WANG, HS.; PAN, QX.; WANG, GX. A biosensor based on immobilization of horseradish peroxidase in chitosan matrix crosslinked with glyoxal for amperometric determination of hydrogen peroxide. **Sensors**, v. 5, n. 4-5, p. 266-276, 2005.

ARTIGOS E APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS

- FERNANDES, S. C.; OLIVEIRA I. R. W. Z.; VIEIRA I. C. A green bean homogenate immobilized on chemically crosslinked chitin for determination of caffeic acid in white wine. **Enzyme Microb. Technol.**, (in press- número 93), 2006.
- FERNANDES, S. C.; VIEIRA I. C. Metodologia analítica para determinação de catecolaminas e fenóis usando enzima de tecido vegetal imobilizada em quitosana. **XV Seminário de Iniciação Científica da UFSC**. 14 e 15 de Setembro, Florianópolis, 2005.
- FERNANDES, S. C.; OLIVEIRA I. R. W. Z.; VIEIRA I. C. Construção de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase em matriz de quitina. **XIII Encontro de Química da Região Sul**. 02 – 04 de Novembro, Florianópolis, 2005. Livro de Resumos. p. QA091.
- FERNANDES, S. C.; OLIVEIRA I. R. W. Z.; VIEIRA I. C.; LARANJEIRA, M. C. M. Biossensor contendo peroxidase incorporada em matriz de quitina para a determinação de ácido cafeico em vinhos. **XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**. 04 – 07 de Dezembro, Londrina, 2005. Livro de Resumos. p. 147.