

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Curso de Pós-Graduação em Química

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES E
SENSORES BIOMIMÉTICOS PARA
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Inês Rosane Welter Zwirtes de Oliveira

Florianópolis - SC
2007

*DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES
E SENSORES BIOMIMÉTICOS PARA
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS*

Inês Rosane Welter Zwirtes de Oliveira

*Trabalho apresentado ao Programa de Pós-
Graduação do Departamento de Química da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Química, área de
concentração Química Analítica.*

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

*Florianópolis – SC
2007*

Inês Rosane Welter Zwirtes de Oliveira

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES
E SENSORES BIOMIMÉTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS**

*Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Doutor em Química** no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina*

Florianópolis, 02 de março de 2007

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Iolanda da Cruz Vieira
Orientadora

Dr. Lúcio Angnes
(USP – São Paulo)

Dr. Orlando Fatibello-Filho
(UFSCar – São Carlos)

Dr. Ademir Neves
(UFSC – Florianópolis)

Dr. Almir Spinelli
(UFSC – Florianópolis)

Dr^a. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
(UFSC – Florianópolis)

Com amor a Deus.

Dedico

*Com muito carinho aos meus pais
Maurícia e Ignácio, as minhas
irmãs Elveni, Noeli e Marli
e ao meu marido André.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

- À Prof^a. Dr^a. Iolanda da Cruz Vieira, pela orientação, incentivo, dedicação, esmero e entusiasmo com o qual acompanhou todo o trabalho.
- Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho, pelas contribuições no trabalho e incentivo.
- Ao Prof. Dr. Ademir Neves e a Renata Osório pela contribuição no trabalho e pela síntese do complexo usado no sensor biomimético.
- Ao Prof. Almir Spinelli, pelas contribuições e por ceder o Potenciostato/Galvanostato, no qual grande parte do trabalho foi desenvolvido.
- Ao meu orientador espiritual Pe. Luiz Carlos Pereira e aos amigos do grupo Nossa Senhora da Graças do Rio de Janeiro.
- À Suellen, pela amizade, alegria e pelas análises de titulação condutimétrica.
- Aos demais amigos e colegas dos laboratórios 312 e 314.
- À Universidade Federal de Santa Catarina e a todos os professores do departamento, especialmente àqueles que contribuíram para minha formação acadêmica e contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho.

- Ao Hospital Universitário de Florianópolis, SC, pela doação dos produtos farmacêuticos.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

GLOSSÁRIO	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABELAS	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	XIII
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	1
1.1 HISTÓRICO E PROPRIEDADES DAS ENZIMAS	1
1.1.1 Peroxidases.....	3
1.1.2 Polifenol oxidase (PFO).....	5
1.1.3 Fosfatases ácidas púrpuras	9
1.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	11
1.2.1 Imobilização por adsorção.....	12
1.2.2 Formação de ligação covalente ou ligação covalente cruzada	12
1.2.2.1 Procedimento envolvendo ligação covalente	13
1.2.2.2 Procedimento envolvendo ligação química covalente cruzada	13
1.2.3 Enzimas imobilizadas por oclusão (encapsulação)	13
1.2.3.1 Método da oclusão em matriz polimérica	13
1.2.3.2 Método de oclusão em cápsulas	14
1.2.4 Quitosana - suporte sólido usado para a imobilização da peroxidase.....	14
1.2.4.1 Reticulação da quitosana	16
1.3 BIOCENSORES E SENSORES BIOMIMÉTICOS	17
1.3.1 Biossensores.....	17
1.3.2 Extrato de vegetais (homogenato) – Fonte enzimática	20
1.3.3 Biossensores e nanotecnologia.....	23

1.3.4 Química biomimética de enzimas artificiais.....	26
1.3.4.1 Sensores biomiméticos	27
1.4 SUBSTRATOS	30
1.4.1 Hidroquinona	30
1.4.2 Rutina	31
1.4.3 Dopamina	33
2. OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
2.2.1 Biossensores.....	34
2.2.2 Sensores biomiméticos	35
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	37
3.1 EQUIPAMENTOS E ELETRODOS	37
3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	38
3.3 BIOSSENSORES.....	41
3.3.1 Obtenção do extrato enzimático (homogenato).....	41
3.3.2 Determinação da atividade enzimática.....	41
3.3.3 Determinação da proteína total	42
3.3.4 Estudo do tempo de reticulação da quitosana com glutaraldeído	43
3.3.5 Determinação do grau de desacetilação da quitosana (% GD).....	43
3.3.6 Reticulação da quitosana e imobilização da peroxidase	44
3.3.6.1 Reticulação dos grupos amino da quitosana com glutaraldeído (I).....	44
3.3.6.2 Reticulação dos grupos amino e ativação das hidroxilas com glutaraldeído-carbodiimida (II).	44
3.3.6.3 Reticulação dos grupos amino e hidroxila da quitosana com glutaraldeído e epícloridrina (III).	44

3.3.6.4 Imobilização da peroxidase	45
3.3.7 Construção dos biossensores	46
3.3.8 Medidas eletroanalíticas e aplicação dos biossensores	46
3.3.9 Seleção do biossensor (III) para determinação de rutina em fármacos	47
3.4. SENSORES BIOMIMÉTICOS	48
3.4.1 Obtenção dos complexos biomiméticos	48
3.4.2 Construção dos sensores biomiméticos	48
3.4.3 Medidas eletroanalíticas e aplicação dos sensores biomiméticos	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 BIOSSENSORES USANDO EXTRATO DE JILÓ COMO FONTE DA ENZIMA PEROXIDASE, IMOBILIZADA EM QUITOSANA PREVIAMENTE RETICULADA POR DIFERENTES PROCEDIMENTOS.	50
4.1.1 Seleção dos vegetais e obtenção da enzima peroxidase	50
4.1.2 Efeito do pH sobre a atividade de extração da peroxidase	52
4.1.3 Tempo de armazenamento e estabilidade da peroxidase	53
4.1.4 Grau de desacetilação (% GD) da quitosana	55
4.1.5 Estudo do tempo de reticulação da quitosana com glutaraldeído	56
4.1.6 Imobilização da peroxidase na matriz da quitosana reticulada com glutaraldeído	58
4.1.7 Imobilização da peroxidase na matriz da quitosana reticulada com glutaraldeído e carbodiimida	60
4.1.8 Imobilização da peroxidase na matriz da quitosana reticulada com glutaraldeído e epicloridrina	63
4.1.9 Otimização dos biossensores	65
4.1.9.1 Estudo de grafite/Nujol	65
4.1.9.2 Estudo da concentração da peroxidase de extrato de jiló	66

4.1.9.3 Efeito do pH.....	67
4.1.9.4 Estudo dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.....	68
4.1.10 Voltametria cíclica	71
4.1.11 Voltametria de onda quadrada	73
4.1.12 Repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade dos biossensores	75
4.1.13 Estudo de recuperação e determinação de hidroquinona.....	76
4.2 DETERMINAÇÃO DE RUTINA EM FÁRMACOS.....	79
4.2.1 Voltametria cíclica	79
4.2.2 Otimização do biossensor	81
4.2.3 Repetibilidade, reprodutibilidade e seletividade	83
4.2.4 Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica para rutina	84
4.2.5 Estudo de recuperação	86
4.2.6 Determinação de rutina em fármacos	87
4.2.7 Comparação dos resultados obtidos usando o biossensor proposto na determinação de rutina e hidroquinona	88
4.3 SENSOR BIOMIMÉTICO USANDO NOVO COMPLEXO BINUCLEAR DE Cu^{II} MODELO DA POLIFENOL OXIDASE	90
4.3.1 Complexo binuclear de Cu^{II}	90
4.3.2 Voltametria cíclica	91
4.3.3 Estudo do percentual do complexo de Cu^{II}	94
4.3.4 Efeito do pH sobre a resposta do sensor biomimético	95
4.3.5 Estudo dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.....	96
4.3.6 Reprodutibilidade, repetibilidade e seletividade	98
4.3.7 Estudos de recuperação de hidroquinona em cosméticos	98
4.3.8 Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica de hidroquinona.....	100
4.3.9 Determinação de hidroquinona em cosméticos.....	102

4.4 SENSOR BIOMIMÉTICO USANDO COMPLEXO DE $Fe^{II}Fe^{III}$ MODELO FOSFATASE ÁCIDA PÚRPURA PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	103
4.4.1 Complexo $Fe^{II}Fe^{III}$	103
4.4.2 Voltametria cíclica	105
4.4.3 Estudo do percentual do complexo $Fe^{II}Fe^{III}$	107
4.4.4 Influência do peróxido de hidrogênio.....	108
4.4.5 Resposta do sensor biomimético para compostos fenólicos	110
4.4.6 Influência do pH	112
4.4.7 Parâmetros da voltametria de onda quadrada	113
4.4.8 Repetibilidade, reprodutibilidade e interferentes	115
4.4.9 Voltamograma de onda quadrada e curva analítica da dopamina	116
4.4.10 Determinação de dopamina em produto farmacêutico	118
5. CONCLUSÕES	119
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

GLOSSÁRIO

a	Amplitude de pulso de potencial aplicado
BSA	Albumina de soro bovino
EDC	Carbodiimida
Er	Erro relativo
Epc	Potencial de pico catódico
f	Freqüência de aplicação de pulsos
GD	Grau de desacetilação
HRP	Horseshoe peroxidase (peroxidase de raiz forte)
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
PAPs	Fosfatases ácidas púrpuras
PFO	Polifenol oxidase
Per (ox)	Peroxidase estado oxidado
Per (red)	Peroxidase estado reduzido
QTS	Quitosana
R⁺	Radical protoporfirina
S_{red}	Substrato doador de elétrons na forma reduzida
S_{ox}	Substrato doador de elétrons na forma oxidado
U	Atividade (unidade/mL)

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. (A) Estrutura tridimensional da enzima peroxidase (<i>HRP, Horseradish peroxidase</i>) e (B) sítio ativo.....	4
Figura 2. Ciclo catalítico da enzima peroxidase (HRP), R ⁺ = radical protoporfirina, S = substrato doador de elétrons (red = reduzido, ox = oxidado).	5
Figura 3. (A) Estrutura enzima polifenol oxidase da batata doce (<i>Ipomoea batatas</i>) e (B) sítio ativo.	7
Figura 4. Mecanismo proposto para a oxidação do catecol pela PFO	8
Figura 5. Representação esquemática da forma reduzida Fe ^{III} M ^{II} , do sítio ativo das fosfatases ácidas púrpuras extraídas de fontes animais e vegetais.	10
Figura 6. Vantagens da enzima imobilizada em relação à enzima livre.	11
Figura 7. Estrutura química da quitosana.....	15
Figura 8. Esquema dos transdutores mais utilizados e a grandeza física que cada transdutor detecta.	18
Figura 9. Estrutura fundamental dos flavonóides.	31
Figura 10. Estrutura química da rutina.	32
Figura 11. Efeito do pH (4 a 10) sobre a extração da peroxidase de jiló	52
Figura 12. Estudo do tempo de armazenamento (4° C) da atividade específica da peroxidase de jiló, extraído em água, tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) + polyclar SB-100.....	54
Figura 13. Curva de titulação condutométrica da quitosana, titulante (NaOH 0,1 mol L ⁻¹).	56
Figura 14. Curva de titulação condutométrica da quitosana reticulada (30 min de reação), titulada com NaOH 0,1 mol L ⁻¹	57

Figura 15. Esquema da reação entre a quitosana (QTS), glutaraldeído e a enzima peroxidase (procedimento I).....	59
Figura 16. Esquema da reação entre um (a) suporte carboxilado, (b) carbodiimida e (c) enzima.....	60
Figura 17. Esquema da reação entre A (a) quitosana, (b) carbodiimida e (d) enzima, obtendo-se (e) produto final da reação.....	61
Figura 18. Esquema da reação entre a (a) quitosana, (b) glutaraldeído, (c) carbodiimida e (e) enzima peroxidase, (procedimento II).....	62
Figura 19. Reação de reticulação da quitosana com epicloridrina.	63
Figura 20. Esquema da reação entre a (a) quitosana, (b) glutaraldeído, (c) epicloridrina e (d) enzima peroxidase (procedimento III).....	64
Figura 21. Estudo da proporção de grafite/Nujol na construção dos biossensores (I, II, III) em solução de hidroquinona 5×10^{-4} mol L ⁻¹ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ , amplitude de potencial 100 mV e frequência de 100 Hz.	66
Figura 22. Efeito da concentração de peroxidase (0,69 a 8,0 U peroxidase/ mg de pasta de carbono) em hidroquinona $3,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ , 100 mV e 100 Hz.....	67
Figura 23. O efeito do pH (5,0 a 9,0) sobre a resposta dos biossensores em solução de hidroquinona $3,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ , 100 mV e 100 Hz.....	68
Figura 24. Estudo do efeito da frequência (50 a 200 Hz) em solução de hidroquinona $3,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ , peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ e amplitude de 100 mV.....	69

- Figura 25.**Estudo do efeito da amplitude do pulso de potencial (10 a 200 mV) em solução de hidroquinona $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e frequência de 100 Hz.70
- Figura 26.**Esquema do processo enzimático entre a hidroquinona, peróxido de hidrogênio, peroxidase e redução eletroquímica da quinona na superfície do biossensor. Per (ox)= peroxidase estado oxidado, Per (red)=peroxidase no estado reduzido.71
- Figura 27.**Voltamogramas cíclicos obtidos usando os biossensores propostos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e velocidade de varedura 100 mV s⁻¹. Voltamogramas (BI, BII e BIII) obtidos em H₂O₂ $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e (I, II e III) em solução de hidroquinona $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e H₂O₂ $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.....72
- Figura 28.**Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando os biossensores (I), (II) e (III). (a) solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e soluções de hidroquinona nas concentrações (b) $2,5 \times 10^{-4}$; (c) $5,0 \times 10^{-4}$; (d) $1,0 \times 10^{-3}$; (e) $1,5 \times 10^{-3}$; (f) $2,0 \times 10^{-3}$; (g) $2,5 \times 10^{-3}$; (h) $3,0 \times 10^{-3}$; (i) $3,5 \times 10^{-3}$; (j) $4,0 \times 10^{-3}$; (l) $4,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; amplitude de 100 mV s⁻¹ e frequência de 100 Hz.74
- Figura 29.**Curvas analíticas para hidroquinona obtidas com os biossensores propostos usando voltametria de onda quadrada..... 75
- Figura 30.**Voltamogramas cíclicos obtidos usando o biossensor proposto em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) contendo (a) H₂O₂ $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e (b) 3×10^{-3} mol L⁻¹ de rutina e $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ H₂O₂.80
- Figura 31.** Representação esquemática do processo enzimático entre a rutina, peróxido de hidrogênio e a peroxidase.....81

- Figura 32.** (A) Voltamogramas de onda quadrada (a) solução tampão fosfato e solução peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e adição de rutina: (b) $3,4 \times 10^{-7}$; (c) $1,1 \times 10^{-6}$; (d) $2,2 \times 10^{-6}$; (e) $3,3 \times 10^{-6}$; (f) $4,3 \times 10^{-6}$; (g) $5,2 \times 10^{-6}$; (h) $6,3 \times 10^{-6}$; (i) $1,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, amplitude de 30 mV e frequência de 25 Hz. (B) Curva analítica usando o I_{pc} dos voltamogramas de onda quadrada vs concentração de rutina. 85
- Figura 33.** Estrutura do complexo binuclear $[\text{Cu}_2(\text{HL})(\text{OAc})](\text{ClO}_4)_2$ 90
- Figura 34.** Voltamogramas cíclicos utilizando o (A) eletrodo de pasta de carbono e (B) sensor biomimético. Voltamogramas (a, c) obtidos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e (b, d) hidroquinona $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 93
- Figura 35.** Estudo do percentual do complexo Cu^{II} de 5 a 20 % (m/m) do sensor biomimético em solução de hidroquinona $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH (7,0), amplitude de potencial 50 mV, frequência 50 Hz. 95
- Figura 36.** Estudo do pH (5 a 9) sobre a resposta do sensor biomimético em hidroquinona $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, frequência de 50 mV e amplitude de potencial de 50 mV. 96
- Figura 37.** (A) Estudo da frequência de (10 a 100 Hz), (B) estudo da amplitude de (10 a 100 mV) em solução de hidroquinona $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0). 97
- Figura 38.** Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o sensor biomimético (a) solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH (8,0) e soluções de hidroquinona nas concentrações: (b) $6,0 \times 10^{-5}$; (c) $1,2 \times 10^{-4}$; (d) $2,4 \times 10^{-4}$; (e) $3,6 \times 10^{-4}$; (f) $4,7 \times 10^{-4}$; (g) $5,8 \times 10^{-4}$; (h) $8,0 \times 10^{-4}$; (i) $1,1 \times 10^{-3}$; (j) $1,3$

$\times 10^{-3}$; (l) $1,6 \times 10^{-3}$; (m) $1,8 \times 10^{-3}$; (n) $2,0 \times 10^{-3}$; (o) $2,2 \times 10^{-3}$; (p) $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, 80 mV e 80 Hz. 100

Figura 39. Curva analítica de hidroquinona usando o Ipc dos voltamogramas de onda quadrada vs concentração de $6,0 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH (8,0), amplitude de 80 mV e frequência de 80 Hz. 101

Figura 40. Proposta da estrutura do complexo $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ 104

Figura 41. Voltamogramas cíclicos obtidos tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) utilizando o (A) eletrodo de pasta de carbono e (B) sensor biomimético. Voltamogramas (a, c) obtidos em peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e (b, d) em dopamina $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. 106

Figura 42. Estudo do percentual do complexo $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ de 5 a 20 % (m/m) sobre a resposta do sensor biomimético em solução de dopamina $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH (7,0), amplitude de potencial 50 mV, frequência 50 Hz. 107

Figura 43. Influência da concentração do peróxido de hidrogênio ($0,0$ a $9,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) sobre a resposta do sensor biomimético em dopamina $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. 109

Figura 44. Influência do pH (3,0 a 8,0) sobre a resposta do sensor biomimético em dopamina $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio $4,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, frequência de 50 Hz e amplitude de potencial de 50 mV. 112

Figura 45. Estudo da (A) amplitude de potencial (10 a 100 mV) e (B) frequência de (10 a 100 Hz), em solução de hidroquinona $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio $4,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). 114

Figura 46. Voltamogramas de onda quadrada usando o sensor biomimético (a) tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹(pH 7,0), e soluções de dopamina nas concentrações de (b) 5,0x10⁻⁵; (c) 2,5x10⁻⁴; (d) 5,0 x10⁻⁴; (e) 1,5 x10⁻³; (f) 2,5 x10⁻⁴; (g) 3,5 x10⁻⁴; (h) 4,5 x10⁻⁴; (i) 5,5x10⁻³; (j) 6,5x10⁻³ mol L⁻¹, amplitude de potencial 50 mV e frequência de 30 Hz. 117

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB.....	2
Tabela 2. Atividade, proteína total e atividade específica da peroxidase encontrada no extrato bruto de diversos vegetais.....	51
Tabela 3. Estudo de adição e recuperação de hidroquinona em água de processo de revelação fotográfica e de raios-X.....	77
Tabela 4. Determinação de hidroquinona em água de processo de revelação fotográfica e de raios-X	78
Tabela 5. Parâmetros de otimização do biossensor proposto	82
Tabela 6. Estudo de recuperação de rutina em amostras farmacêuticas usando o biossensor proposto	86
Tabela 7. Determinação de rutina em amostras de fármacos usando o método comparativo e biossensor proposto.....	87
Tabela 8. Comparação dos principais resultados obtidos usando o biossensor (III) na determinação de hidroquinona e rutina	89
Tabela 9. Estudos de recuperação de hidroquinona utilizando o sensor biomimético.....	99
Tabela 10. Determinação de hidroquinona usando o sensor biomimético e o método comparativo.....	102
Tabela 11. Resposta relativa para compostos fenólicos usando o sensor biomimético.....	111
Tabela 12. Estudos de recuperação de dopamina padrão	116
Tabela 13. Determinação de dopamina em produtos farmacêuticos usando o método comparativo ¹⁰⁷ e o sensor biomimético	118

RESUMO

Inicialmente, neste trabalho foram selecionados diversos vegetais para obtenção da peroxidase e os maiores valores de atividade foram encontrados no extrato da fruta-de-conde (*Ananas squamosa*), gengibre (*Zingiber officinales Rosc.*) e jiló (*Solanum gilo*) com atividade de 4.264, 4.923 e 4.960 unidades mL⁻¹, respectivamente. Sendo assim, selecionou-se o jiló como fonte da enzima peroxidase e as melhores condições de extração para este vegetal foram obtidas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

A estabilidade do extrato de jiló foi investigada durante 53 dias e no período de 25 dias de estocagem não foram observadas mudanças significativas na atividade específica da enzima para os processos de extração utilizando tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) + polyclar. Após este período, a extração empregando o agente protetor manteve maior atividade específica. Entretanto, optou-se neste trabalho em utilizar o tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) para a extração da peroxidase de jiló.

O grau de desacetilação (GD) da quitosana foi determinado por titulação condutimétrica obtendo-se uma porcentagem de grupos amino livres de 82 %. O máximo de reticulação, 100 %, foi obtido em solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v) a partir de 10 min de reação e o tempo de reticulação usado neste trabalho foi de 30 min.

A peroxidase obtida do extrato de jiló foi imobilizada em quitosana previamente reticulada por três procedimentos: (I) reticulação dos grupos amino da quitosana com glutaraldeído; (II) grupos amino da quitosana reticulados com glutaraldeído e hidroxila ativados com carbodiimida; (III) grupos amino reticulados com glutaraldeído e hidroxila com epícloridrina. A quitosana reticulada pelos três

procedimentos apresentou boa eficiência como suporte para imobilização da peroxidase obtida do vegetal jiló.

Após a reticulação da quitosana e imobilização da peroxidase de jiló foram construídos os biossensores (I), (II) e (III). A melhor resposta destes biossensores foram obtidas na composição de 75/15/10 % (m/m) de grafite:Nujol:quitosana reticulada contendo $1.500 \text{ unidades mL}^{-1}$. Os biossensores foram otimizados usando a voltametria de onda quadrada e a maior resposta analítica obtida foi obtida para hidroquinona em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, frequência de 100 Hz e amplitude de potencial de 100 mV. Estes biossensores apresentaram uma relação linear entre a corrente de pico catódica (I_{pc}) e as concentrações de hidroquinona no intervalo de $2,5 \times 10^{-4}$ a $4,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e bons resultados quanto a repetibilidade (r.s.d. $\leq 1,0 \%$) e reprodutibilidade (r.s.d. $\leq 3,2\%$). Os valores de recuperação de hidroquinona para os biossensores variaram de 95,1 – 105% para o biossensor (I), 97,8 – 101% para biossensor (II) e 98,8 – 103% para o biossensor (III). Os resultados obtidos indicam que os procedimentos analíticos propostos não sofrem interferência da matriz da amostra. A maior sensibilidade foi observada para o biossensor (III), isso pode ser devido à formação efetiva da rede tridimensional polimérica entre a quitosana, epicloridrina e glutaraldeído, que além da enzima estar ligada a um grupo aldeído do glutaraldeído, pode também estar confinada nos espaços formados entre ligações dos reagentes reticulantes e a quitosana.

O biossensor (III) selecionado para determinação de rutina, apresentou características favoráveis para determinação deste flavonóide em fármacos. O melhor desempenho do biossensor foi observado usando solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, amplitude de potencial de 30 mV e frequência de 25 Hz. A curva analítica foi construída a partir do I_{pc} vs a

concentração de rutina, obtendo-se uma relação linear no intervalo de $3,4 \times 10^{-7}$ a $1,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ ($I_{pc} = 30,7 + 4,9 \times 10^7$ [rutina]; $r = 0,9998$) com limite de detecção de $3,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. O estudo de recuperação de rutina variou de 96 a 102 % e os teores obtidos para rutina em formulações farmacêuticas utilizando o biossensor proposto estão em concordância com os valores de rutina rotulados e os valores obtidos pelo método oficial, a um nível de confiança de 95%. Além disso, apresentou alta sensibilidade, boa reprodutibilidade (r.s.d 2,5 %) e repetibilidade (r.s.d 0,9 %). Os resultados indicam boa eficiência do biossensor (III) para determinação de hidroquinona e rutina. Entretanto, os resultados diferem em relação à faixa de linearidade e conseqüentemente em relação ao limite de detecção para cada substrato.

O sensor biomimético contendo complexo binuclear de Cu^{II}, modelo polifenol oxidase foi empregado com sucesso na determinação de hidroquinona em cosméticos. Esse sensor apresentou boa reprodutibilidade (r.s.d 2,8 %), boa repetibilidade (r.s.d 1 %) e resposta linear para hidroquinona de $6,0 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

O sensor biomimético desenvolvido a partir do complexo Fe^{II}Fe^{III} modelo proposto da fosfatase ácida púrpura apresentou resposta para os compostos fenólicos: hidroquinona, catecol, dopamina, metildopa, carbidopa, L-dopa em presença de peróxido de hidrogênio. As condições experimentais para o sensor biomimético foram avaliadas utilizando-se dopamina e sua determinação em fármacos. Foi obtido uma linearidade de $5,0 \times 10^{-5}$ a $6,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e limite de detecção de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, apresentando bons resultados em relação à reprodutibilidade (r.s.d ≤ 6,1 %) e repetibilidade (r.s.d ≤ 2,6 %).

ABSTRACT

In this study, initially, several plants were selected for the obtention of peroxidase and the highest values for activity were found for the sugar apple (*Annona squamosa*), ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and scarlet eggplant (*Solanum gilo*) with activities of 4,264, 4,923 and 4,960 units mL⁻¹, respectively. The scarlet eggplant was selected as a source of the enzyme peroxidase and the best extraction conditions for this plant were obtained in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 7.0).

The stability of the scarlet eggplant extract was investigated for 53 days and during the initial storage period of 25 days no significant changes in the specific activity of the enzyme were observed for the extraction using 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 7.0) and 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 7.0) + polyclar. After this period, the extraction using the protector agent maintained the greatest specific activity. However, in this study the 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.0) was used for the extraction of peroxidase from the scarlet eggplant.

The degree of deacetylation (DA) of the chitosan was determined by conductimetric titration, with 82 % of free amino groups being obtained. The maximum reticulation of 100 % was obtained with a 2.5% (v/v) glutaraldehyde solution after 10 min of reaction and the reticulation time used in this study was 30 min.

The peroxidase obtained from the scarlet eggplant extract was immobilized in chitosan previously reticulated using three procedures: (I) reticulation of the chitosan amino groups with glutaraldehyde; (II) chitosan amino groups reticulated with glutaraldehyde and hydroxyl activated with carbodiimide; (III) amino groups reticulated with glutaraldehyde and hydroxyl with epichloride. The chitosan

reticulated using the three procedures showed a good efficiency as a support for the immobilization of the peroxidase obtained from the scarlet eggplant.

After the reticulation of the chitosan and the immobilization of the scarlet eggplant peroxidase, the biosensors (I), (II) and (III) were constructed. The best biosensor response was obtained with a composition of 75:15:10 % (m/m) of graphite:Nujol:reticulated chitosan containing 1,500 units mL⁻¹. The biosensors were optimized using square wave voltammetry and the best response was obtained for hydroquinone in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 7.0), 2.0x10⁻³ mol L⁻¹ hydrogen peroxide, a frequency of 100 Hz and a potential amplitude of 100 mV. These biosensors showed a linear relation between the cathodic peak current (cpc) and the concentration of hydroquinone in the range from 2.5x10⁻⁴ to 4.5x10⁻³ mol L⁻¹, with a detection limit of 2.0x10⁻⁵ mol L⁻¹ and good results for repeatability (r.s.d. ≤ 1.0 %) and reproducibility (r.s.d. ≤ 3.2%). The hydroquinone recovery values for the biosensors varied from 95.1 to 105% for biosensor (I), 97.8 to 101% for biosensor (II) and 98.8 to 103% for biosensor (III). The results obtained indicated that the proposed analytical procedures do not suffer interference from the sample matrix. The greatest sensitivity was observed for biosensor (III). This may be due to the effective formation of the polymer three-dimensional network between the chitosan, epichloride and glutaraldehyde, and besides the enzyme being bound to an aldehyde group of the glutaraldehyde, it may also be confined to the spaces formed between the bonds of the reticulation reagents and the chitosan.

Biosensor (III) was selected for the rutin determination, showing characteristics favorable for the determination of this flavonoid in medicines. The best biosensor performance was observed using a 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 7.0), 2.0x10⁻³ mol L⁻¹ hydrogen peroxide, a potential amplitude of 30 mV and a frequency of 25 Hz. The analytical curve was constructed from the cpc vs the

rutin concentration, obtaining a linear relation in the range from 3.4×10^{-7} to 1.2×10^{-6} mol L⁻¹ (cpc=30.7 + 4.9×10^7 [rutin]; r=0.9998) with a detection limit of 3.0×10^{-8} mol L⁻¹. The rutin recovery varied from 96 to 102 % and the values obtained for the rutin in pharmaceutical formulations using the proposed biosensor are in agreement with the labeled rutin values and the values obtained using the official method, at a confidence level of 95%. In addition, it showed a high sensitivity, good reproducibility (r.s.d 2.5 %) and repeatability (r.s.d 0.9 %). The results indicate a good efficiency of biosensor (III) for the determination of hydroquinone and rutin. However, the results differ in relation to the range of linearity and consequently in relation to the detection limit for each substrate.

The biomimetic sensor containing a Cu^{II} binuclear complex, a polyphenol oxidase model, was successfully employed in the determination of hydroquinone in cosmetics, confirming that highly complex enzymatic systems may be satisfactorily replaced by simpler molecules. The sensor showed a good reproducibility (r.s.d 2.8 %), good repeatability (r.s.d 1 %) and a linear response for hydroquinone from 6.0×10^{-5} to 2.5×10^{-3} mol L⁻¹ with a detection limit of 3.0×10^{-6} mol L⁻¹.

The biomimetic sensor developed with a Fe^{II}Fe^{III} complex showed a good response to the phenolic compounds: hydroquinone, catechol, dopamine, methyl dopa, carbidopa, and L-dopa in the presence of hydrogen peroxide. This is similar to the catalytic activity of the proposed purple acid phosphate model with the enzyme peroxidase. The experimental conditions for the biomimetic sensor were evaluated using dopamine and its determination in medicines. A linearity from 5.0×10^{-5} to 6.5×10^{-3} mol L⁻¹ and a detection limit of 1.0×10^{-6} mol L⁻¹ were obtained showing good results in relation to reproducibility (r.s.d ≤ 6.1 %) and repeatability (r.s.d ≤ 2.6 %).

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 HISTÓRICO E PROPRIEDADES DAS ENZIMAS

A enzimologia, estudo das enzimas compreende grande parte da história da bioquímica que investigou durante séculos a fermentação e digestão dos alimentos. Em 1810, Joseph Gay-Lussac teve um avanço considerável nos estudos sobre a fermentação e determinou que os principais produtos da decomposição do açúcar por levedo são o etanol e o dióxido de carbono¹.

Em meados do século XIX, Louis Pasteur postulou que os fermentos eram inseparáveis da estrutura da célula viva e introduziu o conceito de que as enzimas eram células vivas. No entanto, Justus Liebig, argumentou que o processo biológico da fermentação era promovido pela ação de substâncias químicas. Em 1878, Fredrich Wilhelm Kuhne denominou estas moléculas de enzimas (Grego: *en*, in + *zyme*, yeast). Somente em 1897, Eduard Buchner descobriu que o extrato de levedura pode fermentar o açúcar em álcool, comprovando que a fermentação foi promovida por moléculas que mantêm suas funções mesmo quando removidas das células vivas. Em 1926, James Summer cristalizou a primeira enzima, a *urease*, que catalisa a hidrólise da uréia em NH_3 e CO_2 ^{1,2}.

As enzimas são biomoléculas complexas com alta massa molar, constituídas por longas cadeias de aminoácidos interligados através de ligações peptídicas. O centro ativo, local onde se processam as reações com o substrato é geralmente constituído por alguns resíduos de aminoácidos ou ainda dependendo do tipo de enzima pode conter um grupo não-protéico responsável pela eficiência catalítica. Algumas enzimas dependem somente da sua própria estrutura protéica (apoenzima) para exercer sua atividade, enquanto outras necessitam também de um ou mais componentes não-protéicos (cofatores), que podem ser íons metálicos ou moléculas

orgânicas denominadas de coenzimas. Muitas enzimas dependem de ambos. Outras possuem um grupo prostético que é similar ao cofator, mas está firmemente ligado à apoenzima. O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator é denominado de haloenzima^{1,2}.

As enzimas desempenham a função de catalisar diversas reações biológicas e podem aumentar a velocidade de uma reação por um fator de 10^{14} quando comparada a uma reação não catalisada. Portanto, as enzimas apresentam um alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas específicas e a maioria atua em soluções aquosas e em condições brandas de temperatura e pH¹⁻³.

As enzimas são classificadas em grupos conforme a natureza das reações químicas que catalisam. De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, em inglês) são divididas em seis grupos, listados na Tabela 1^{1,4}.

Tabela 1. Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB.

Ordem	Classe	Tipo de reação catalisada	Subclasse
1	Oxidoreduases	Oxidação e redução	Peroxidases, hidrogenases
2	Transferases	Transferência de grupos funcionais	Transaldolases, transcetolases
3	Hidrolases	Hidrólise de ligações	Lipases, fosfatases
4	Liasas	Adição de grupos a duplas ligações/formação de duplas ligações pela remoção de grupos	Descarboxilases, desidratases
5	Isomerases	Isomerização do substrato	Racemases
6	Ligases	Formação de ligações	Sintetases

1.1.1 Peroxidases

A atividade enzimática das peroxidases foi observada pela primeira vez em 1855 por Schönbein, ao notar que extrato de plantas em soluções de guaiacol causava o aparecimento da cor azul na presença de peróxido de hidrogênio. Linossier em 1898 isolou esta enzima do tecido de raiz forte (*HRP*, do inglês *Horseradish peroxidase*) e denominou-a de *peroxidase*. No entanto, as investigações fundamentais sobre a estrutura química, cinética e mecanismo destas enzimas foram detalhadamente estudadas por diversos pesquisadores a partir de 1920⁵⁻¹¹.

As peroxidases são vastamente distribuídas no reino animal e vegetal. A peroxidase extraída da raiz forte é a principal representante dessa classe de enzimas, sendo a mais estudada e de maior importância comercial. No entanto, estudos relacionados à extração, purificação, identificação e propriedades catalíticas das peroxidases tem sido investigados em diversos vegetais, tais como: pêssigo, tomate, soja, rabanete, abobrinha, nabo, aspargo, uva, ervilha, casca de maçã, kiwi, manga, morango, couve de bruxelas, laranja, carambola, chicória, açaí, abacaxi, entre outros¹¹⁻²³. A Figura 1 mostra a estrutura tridimensional da peroxidase da raiz forte e seu respectivo sítio ativo.

As peroxidases (E.C. 1.11.1.7) pertencem a classe das oxireductases e possuem no sítio ativo um grupo Fe^{3+} protoporfirínico, catalisa reações de oxidação de vários substratos doadores de prótons, como: monofenóis, difenóis, polifenóis e aminofenóis na presença de peróxido de hidrogênio.

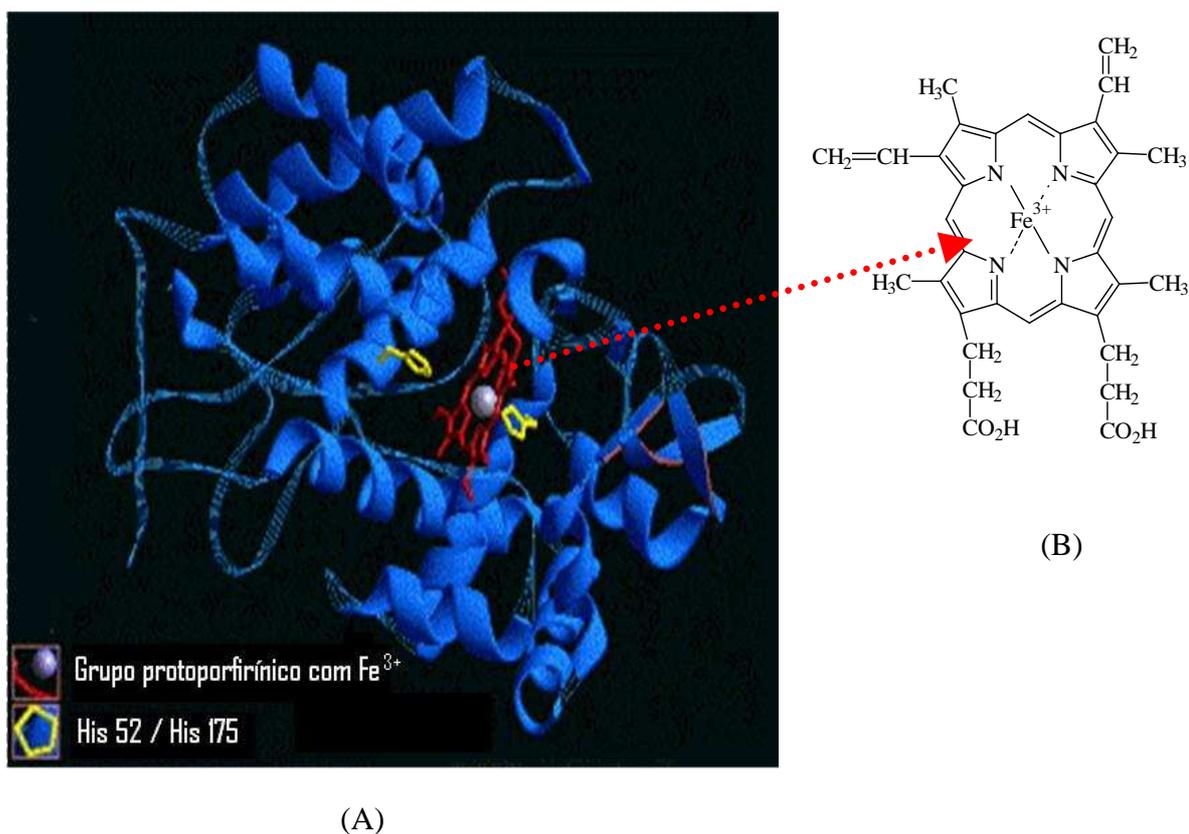


Figura 1. (A) Estrutura tridimensional da enzima peroxidase e (B) sítio ativo.

Um esquema simplificado na Figura 2 mostra o mecanismo de reação da peroxidase em presença de peróxido de hidrogênio e o substrato doador de elétrons (S). Na primeira etapa (a) ocorre a transferência de dois elétrons, referente à oxidação do grupo prostético Fe^{3+} da enzima nativa pelo peróxido de hidrogênio, gerando o composto I, que consiste no ferro oxiferrila ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) e o radical protoporfirina (R^{\cdot}). A etapa (b) consiste na oxidação de uma molécula do substrato (S_{red}) com conseqüente formação do substrato oxidado (S_{ox}) e geração do composto II ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$). Na última etapa do processo (c), a enzima reage com uma segunda molécula do substrato retornando ao seu estado nativo⁵⁻¹⁰.

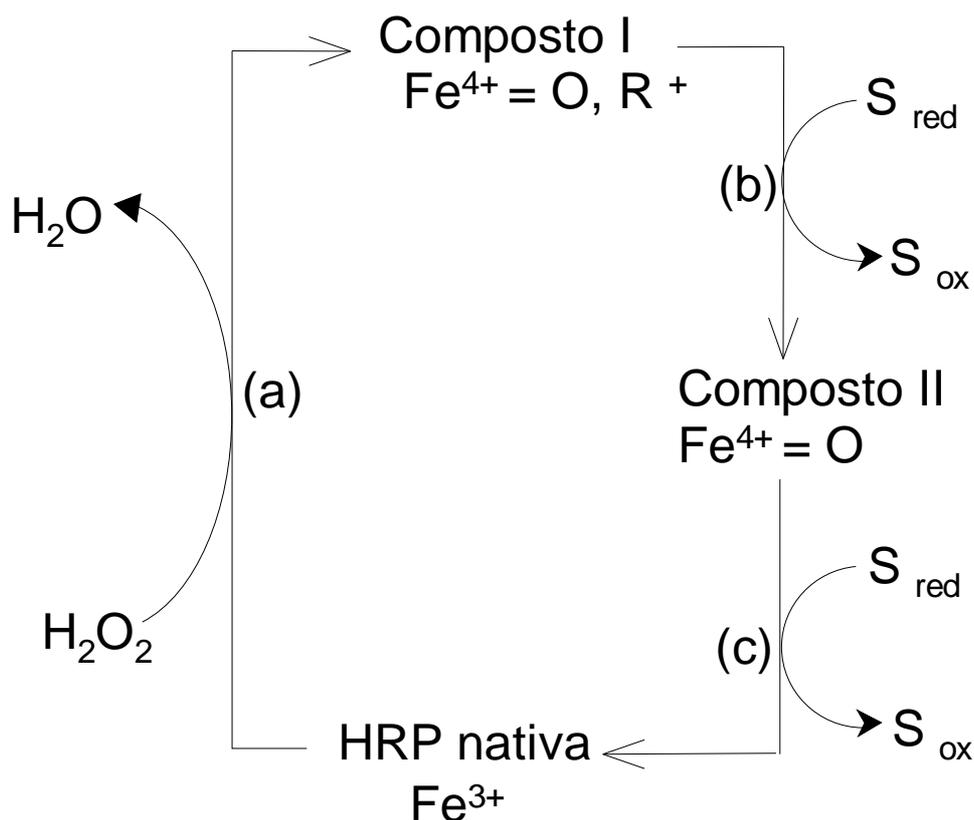


Figura 2. Ciclo catalítico da enzima peroxidase (HRP), R^+ = radical protoporfirina, S = substrato doador de elétrons (red = reduzido, ox = oxidado).

As peroxidases são empregadas na indústria devido as suas propriedades catalíticas, versatilidade de reconhecer diversos substratos e a termoestabilidade. Apresentam aplicações na área de síntese orgânica, remoção de compostos fenólicos em resíduos industriais, construção e aplicação de biossensores, imunoenaios enzimáticos, entre outros²⁴⁻²⁷.

1.1.2 Polifenol oxidase (PFO)

A polifenol oxidase, (PFO: E.C.1.14.18.1) também denominada de tirosinase, catecolase ou catecol oxidase, pertence a classe das oxidoreductases. Em presença de oxigênio molecular catalisa a oxidação de monofenóis e difenóis as

correspondentes quinonas e pode ser encontrada em bactérias, fungos, plantas, frutos e em alguns insetos e crustáceos^{10,28-30}. A atividade enzimática obtida de vegetais varia em relação a espécie, período do ano, estado de amadurecimento e local de plantio. Está presente em altas concentrações em cogumelos, batata, pêssigo, banana, manga, abacate, folhas de chá e café. Nos tecidos vegetais, esta enzima localiza-se nos cloroplastos e é responsável pelo escurecimento de uma variedade de frutas e legumes quando cortados e expostos ao ar. Este escurecimento é causado pela oxidação de compostos fenólicos naturais as correspondentes *o*-quinonas em presença de oxigênio atmosférico e a PFO¹⁰.

O sítio ativo da PFO consiste em dois centros metálicos de cobre, na forma oxidada e encontra-se como Cu(II)-OH-Cu(II), em que cada cobre está coordenado por três átomos de nitrogênio, resíduos de histidinas e um grupo hidróxido fazendo ponte entre os dois centros metálicos. A estrutura da PFO foi obtida pela primeira vez em 1998, por cristalografia de raios-X, a partir da batata doce (*Ipomoea batatas*)³¹, Figura 3.

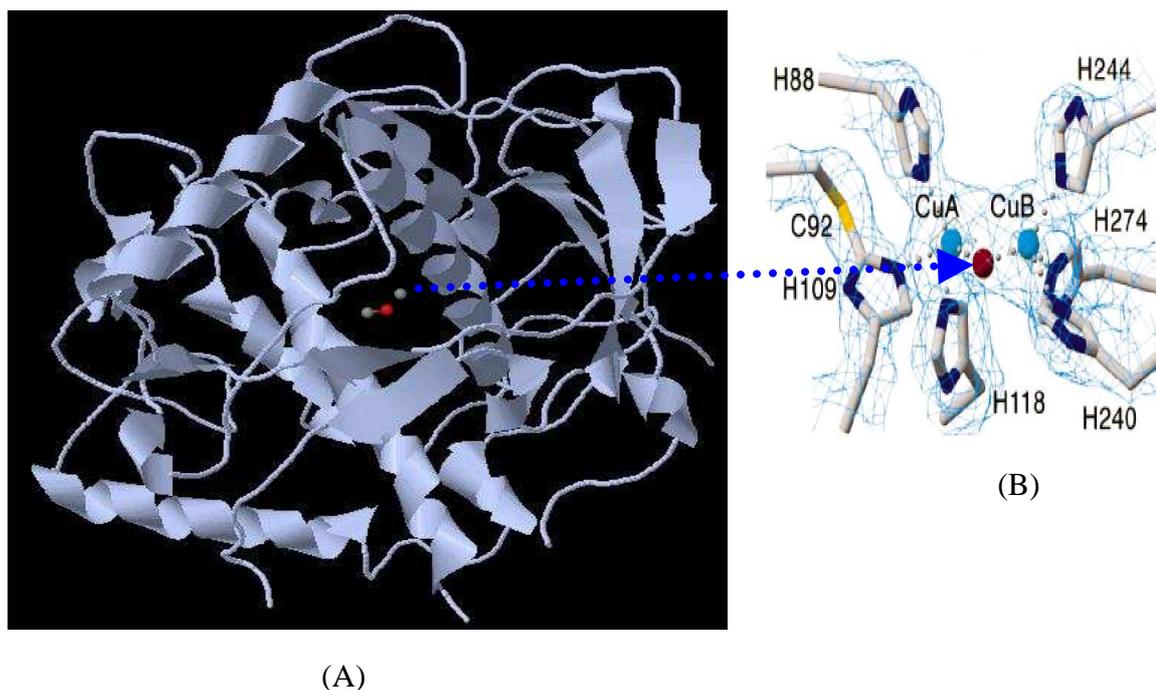


Figura 3. (A) Estrutura da enzima polifenol oxidase da batata doce³¹ e (B) sítio ativo.

A Figura 4 mostra um mecanismo simplificado dessa enzima em presença de catecol e oxigênio molecular. O ciclo catalítico se inicia na forma *met*, onde o substrato liga-se após a desprotonação de um de seus grupos hidroxilas de forma monodentada ao átomo de Cu(II). Este processo é seguido pela oxidação do substrato com formação da primeira quinona e a conseqüente forma reduzida da enzima. A incorporação de oxigênio molecular gera o estado *oxy* da enzima a qual reage com a segunda molécula de substrato que se coordena após a desprotonação de uma de suas hidroxilas. A oxidação do difenol a quinona regenera o estado *met* da enzima encerrando o ciclo catalítico³¹.

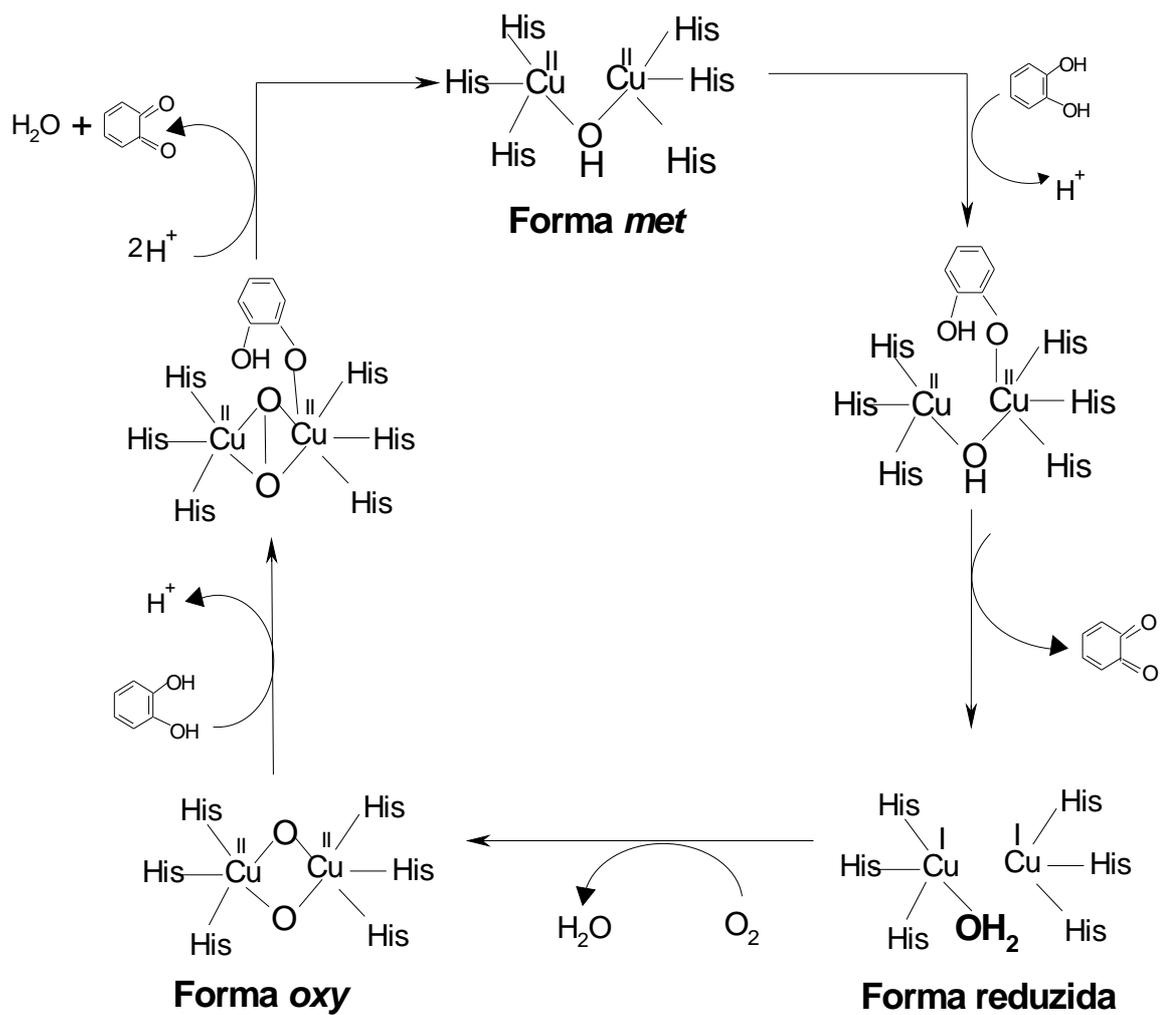


Figura 4. Mecanismo proposto para a oxidação do catecol pela PFO³¹.

1.1.3 Fosfatases ácidas púrpuras

As fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) são metaloproteínas binucleares que catalisam a hidrólise de ésteres de fosfato numa faixa ótima de pH entre 2 a 7. Apresentam coloração púrpura característica, o que faz com que sejam conhecidas genericamente como fosfatases ácidas púrpuras. Estas enzimas têm sido isoladas de diversos tecidos animais e vegetais. Entre as fontes animais, podem-se citar as enzimas isoladas do baço bovino e do fluído uterino suíno (uteroferrina). Da classe das plantas, uma das fosfatases mais estudadas é a isolada do feijão vermelho e da batata doce. As fosfatases ácidas isoladas de bactérias são as menos conhecidas, tendo sido isoladas da *Aspergillus ficcum* e *Neurospora crasa*. As PAPs, sejam de fontes vegetais ou animais, possuem centros metálicos binucleares quimicamente idênticos no que diz respeito à esfera de coordenação dos metais. As PAPs encontradas em mamíferos podem apresentar-se em dois estados de oxidação: estado oxidado ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$) e reduzida e/ou de valência mista ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$). O estado na forma oxidada é inativa para a hidrólise de ésteres fosfato e a forma reduzida é ativa³²⁻³⁵. Uma representação esquemática da forma reduzida ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$) do sítio ativo destas enzimas encontra-se representada na Figura 5.

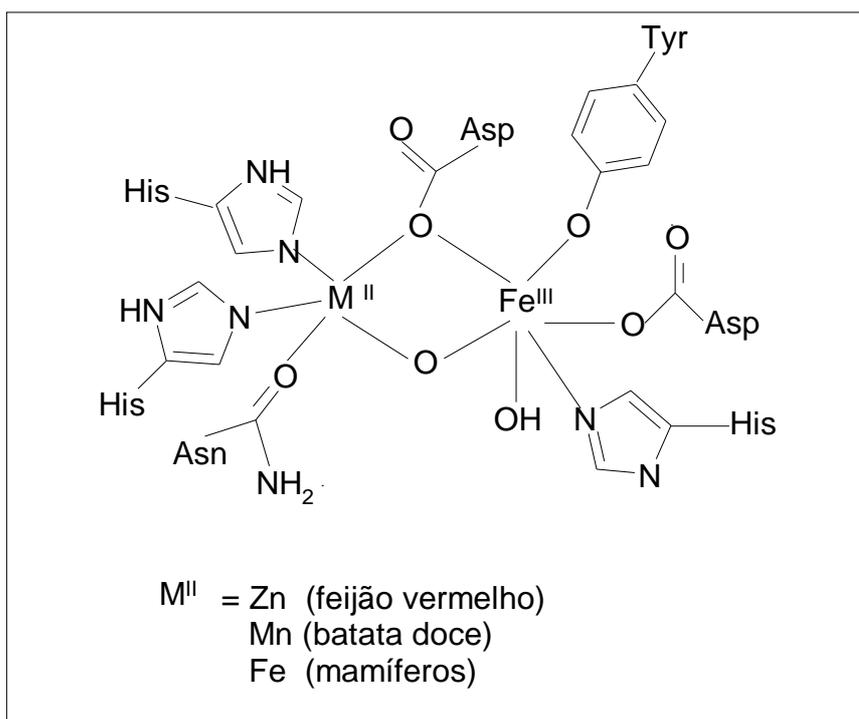


Figura 5. Representação esquemática da forma reduzida $Fe^{III}M^{II}$, do sítio ativo das fosfatases ácidas púrpuras extraídas de fontes animais e vegetais.

Os complexos binucleres de ferro tem atraído atenção de diversos pesquisadores da área de química bioinorgânica, devido a sua ocorrência em vários organismos e seu envolvimento em diversas funções biológicas. Tem sido sugerido que estas enzimas além de atuar na hidrólise de ésteres fosfato, atuam também na degradação das células dos eritrócitos, no transporte de ferro em fetos, no controle de reabsorção óssea por parte dos osteoclastos, na produção de hidróxi-radicaís e espécies reativas de oxigênio³⁶⁻⁴².

1.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

São indiscutíveis as vantagens da utilização de enzimas em diversas reações catalíticas. No entanto, existe uma diversidade de problemas quando essas enzimas são empregadas na prática para interesse industrial e na pesquisa científica. Estas dificuldades têm sido amenizadas com o desenvolvimento de novas técnicas de imobilização. No processo de imobilização de enzimas, o material biológico é fixado (aprisionado) em um suporte resultando na insolubilização da enzima em meio aquoso⁴³⁻⁴⁹. Após a imobilização, as enzimas apresentam diversas vantagens em relação às enzimas livres, como mostra o esquema da Figura 6.

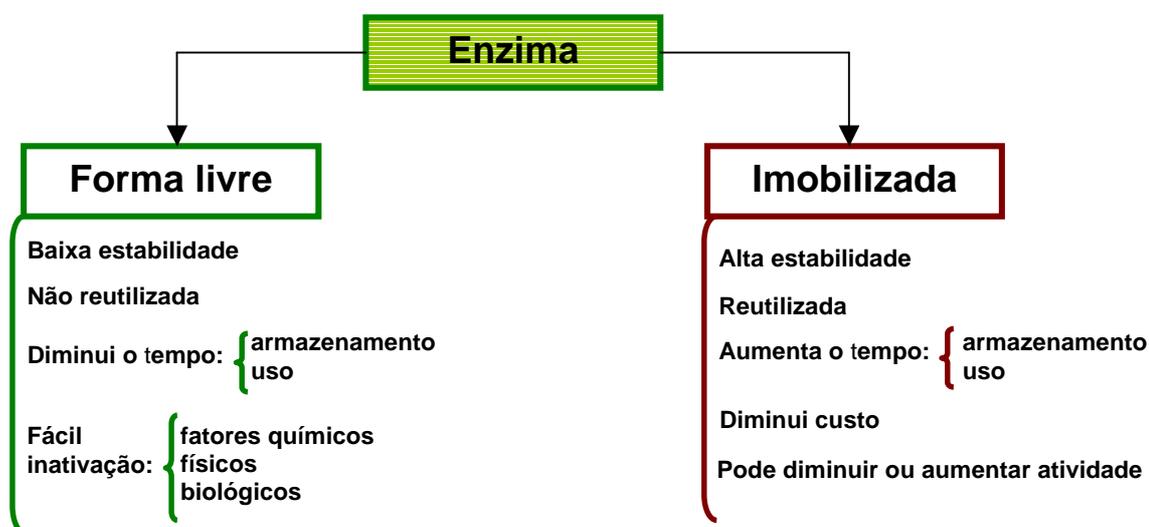


Figura 6. Vantagens da enzima imobilizada em relação à enzima livre⁴³⁻⁴⁹.

As características apresentadas pelas enzimas depois de imobilizadas dependem principalmente da escolha apropriada do suporte e dos reagentes utilizados no processo de imobilização, visando manter a integridade do sítio ativo da enzima⁴³⁻⁴⁹. Existem vários métodos que utilizam diferentes suportes e agentes reticulantes ou ativadores para imobilização de enzimas. A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através das ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação em membrana polimérica⁴³⁻⁵⁴.

1.2.1 Imobilização por adsorção

A adsorção apresenta como vantagem a simplicidade e por isso é um dos métodos mais utilizados. A enzima é imobilizada num suporte sólido por interações de van der Waals, ligações de hidrogênio fracas e iônicas. Para que a imobilização da enzima seja eficiente o suporte deve apresentar algumas características, tais como: força mecânica, estabilidade química e física, capacidade de adsorção da enzima e viabilidade econômica. Uma das principais desvantagens deste método é a dessorção da proteína do suporte. Os materiais comumente utilizados para imobilização por adsorção possuem superfície ativa (grafite, argila, alumina, resina de troca iônica, entre outros)⁴³⁻⁵⁴.

1.2.2 Formação de ligação covalente ou ligação covalente cruzada

Esses métodos de imobilização são muito utilizados por apresentar como vantagem a forte ligação da proteína com o suporte sólido, diminuindo o processo de

dessorção da enzima do suporte e apresentando maior estabilidade em relação aos efeitos de variação de pH, da força iônica e do solvente. No entanto, estes métodos de imobilização podem causar a perda da atividade enzimática devido à possibilidade de reação com os grupos funcionais do sítio ativo da enzima⁴³⁻⁵⁴.

1.2.2.1 Procedimento envolvendo ligação covalente

Baseia-se na imobilização da enzima por ligação covalente de grupos funcionais não ativos da enzima com grupos reativos (hidroxila, carbonila, amino, fenólico, imidazólico, tiol) do suporte sólido que incluem polímeros (colágeno, amido celulose, agar-agar) e materiais inorgânicos (óxidos metálicos, pérolas de vidro com porosidade controlada)⁴³⁻⁵⁴.

1.2.2.2 Procedimento envolvendo ligação covalente cruzada

Baseia-se na formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas das enzimas e os grupos funcionais do suporte inerte com a utilização de reagentes funcionais. Alguns reagentes reticulantes e ativadores incluem glutaraldeído, diazobenzidina, carbodiimida, ácido bisdiazobenzidínico, triclorotriazina, sendo que o reagente mais empregado é o glutaraldeído, pois confere a enzima uma boa estabilidade. Os suportes mais utilizados incluem polímeros naturais, sintéticos e materiais inorgânicos⁴³⁻⁵⁴.

1.2.3 Enzimas imobilizadas por oclusão (encapsulação)

1.2.3.1 Método da oclusão em matriz polimérica

Este método envolve o confinamento da enzima nos espaços formados entre as ligações covalentes cruzadas de um polímero insolúvel não sofrendo nenhuma modificação na estrutura da enzima⁴³⁻⁵⁴.

1.2.3.2 Método de oclusão em cápsulas

O método se baseia no confinamento da enzima em microcápsulas, em que a enzima não interage quimicamente com o suporte, permanecendo praticamente recoberta pelo sistema (esferas), mantendo facilmente a atividade enzimática. O método por oclusão possui a vantagem de imobilizar várias enzimas em uma só etapa e tem como principal desvantagem a diminuição da atividade enzimática durante a utilização, devido à perda de enzimas pelos poros maiores⁴³⁻⁵⁵.

1.2.4 Quitosana - suporte usado para a imobilização da peroxidase

A quitina, $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-deoxi-D-glicose, é o segundo polissacarídeo natural mais abundante encontrado na natureza e está presente em uma variedade de animais marinhos (caranguejo, camarão, lagosta), insetos, e alguns fungos como *aspergillus* e *mucor*. A quitosana, constituída predominantemente de unidade de $\beta(1-4)$ -2-amino-2-deoxi-D-glicose, é obtida a partir da desacetilação da quitina por processo de hidrólise básica^{53,56-58}. É considerada uma base fraca, sendo insolúvel em água e solventes orgânicos, no entanto, é solúvel em soluções ácidas diluídas (pH < 6,5). Precipita em soluções alcalinas ou com poliânions e forma um gel em pH baixo. Possui um grupo amino primário e dois grupos hidroxila livres para cada unidade C₆, como mostra a Figura 7, sendo que a quantidade de grupos amino presentes é dependente do grau de desacetilação que varia de acordo com a pureza da quitosana⁵⁶.

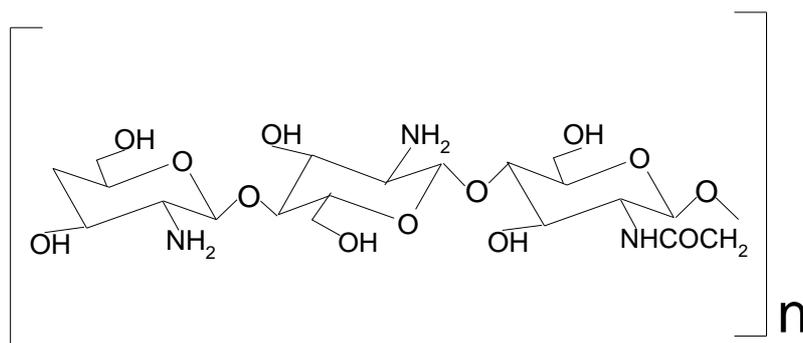


Figura 7. Estrutura química da quitosana.

Propriedades tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade e boa biocompatibilidade tornam este polímero favorável para uso na medicina, em produtos farmacêuticos, na agricultura, em biotecnologia, na indústria de alimentos, e tratamento de efluentes industriais⁵⁶⁻⁵⁸.

A quitosana também é considerada um suporte ideal para a imobilização de enzimas, devido ao grande percentual de grupos amino e hidroxila disponíveis em sua estrutura química. Diversos pesquisadores vêm empregando com sucesso esse biopolímero para imobilização de enzimas. Delanoy e outros⁵⁹ estudaram a estabilidade e a atividade da lacase imobilizada em quitosana e comprovaram que a enzima apresentou estabilidade superior quando comparada com a lacase-livre. Microesferas, filmes, pó ou ainda membranas de quitosana também tem sido empregada com sucesso na imobilização de diversas enzimas, como: creatinase deaminase⁶⁰, galactose oxidase⁶¹, glicose oxidase⁶², glutamato oxidase⁶³, peroxidase⁶³⁻⁶⁵, lactato oxidase⁶⁶ e sulfito oxidase^{67,68}.

Recentemente, Feng e outros⁶⁹ imobilizaram hemiproteínas (mioglobina, hemoglobina e citocromo c) via adsorção em filme de quitosana estabilizada por nanopartículas de ouro. Os resultados mostraram que o filme quitosana/ouro depositado em eletrodo de ouro, não somente é um ambiente adequado para

imobilização das proteínas como também facilita a transferência de elétrons entre as proteínas e o eletrodo. O eletrodo foi utilizado na determinação de peróxido de hidrogênio e apresentou estabilidade durante 3 meses e boa reprodutibilidade.

Luo e outros⁷⁰ depositaram eletroquimicamente filme de quitosana na superfície de um eletrodo de ouro, em seguida nanopartículas de ouro e posteriormente a enzima peroxidase (HRP) foi adsorvida na superfície do filme. O eletrodo apresentou linearidade de $8,0 \times 10^{-6}$ a $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para a determinação de H₂O₂, com limite de detecção de $2,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

1.2.4.1 Reticulação da quitosana

A reticulação química de um polímero pode ser requerida a partir de compostos de baixa massa molar que promovem a interligação das cadeias poliméricas, formando uma rede de estrutura tridimensional⁷¹.

A quitosana possui grupos funcionais (OH e NH₂) que podem ser modificados quimicamente a partir de ligações intermoleculares e/ou ligações cruzadas formadas entre o agente reticulante e o polímero. Essas modificações aumentam a resistência mecânica, a estabilidade, à resistência contra a degradação bioquímica e microbiológica e ainda, diminui a solubilidade na maior parte dos ácidos orgânicos e minerais⁷²⁻⁷⁵.

A reticulação da quitosana pode ser realizada usando diversos agentes reticulantes, tais como, o glutaraldeído, 1,1,3,3-tetrametoxipropano, etileno glicol, D,L gliceraldeído, diglicidil éter, epiclorigrina, clorometiloxirano, carbodiimida, ácido bisdiazobenzidínico, triclorotriazina, entre outros^{74,76}. No entanto, os aldeídos são os mais utilizados especialmente o glutaraldeído⁷⁷⁻⁸⁰. Este agente de reticulação pode ser usado para inibir a solubilização através da formação da base de Schiff com os

grupos aminos livres da unidade glucosamina do polímero⁸¹⁻⁸³. O inconveniente encontrado na utilização deste reticulante é a toxicidade^{84,85}. O D,L-gliceraldeído e genipin tem sido apontado como alternativa devido a sua baixa toxicidade⁸⁶. Reagentes como a epiclorigrina e a carbodiimida tem sido utilizada com sucesso na reticulação dos grupos hidroxila da quitosana^{74,83,87}.

1.3 BIOSSENSORES E SENSORES BIOMIMÉTICOS

1.3.1 Biossensores

Biossensor é um dispositivo que transforma a informação biológica em um sinal analítico proporcional à concentração do analito na amostra. Quando o elemento de reconhecimento é de natureza sintética (análogos sintéticos de enzimas e polímeros sintéticos), estes sensores podem ser denominados de sensores biomiméticos e/ou quimiosensores. O material biológico utilizado na construção de biossensores é muito variado, incluindo enzimas, antígenos, anticorpos, DNA, organelas, tecidos vegetais como fontes enzimáticas, entre outros^{43,44,49}.

A escolha do material biológico mais adequado para cada sistema depende das propriedades de cada amostra e do tipo de grandeza física a ser detectada pelo transdutor^{43,44,49}. Os transdutores são classificados conforme a grandeza física que detectam, subdivididos em dois grupos principais: eletroquímicos e eletromagnéticos. A Figura 8 mostra o esquema dos transdutores e as respectivas grandezas físicas que cada transdutor é capaz de detectar. Entre os transdutores apresentados, os eletroquímicos são os mais utilizados e a maioria dos biossensores desenvolvidos são amperométricos e potenciométricos. Os biossensores potenciométricos baseiam-se na combinação do sensor íon-seletivo com um tecido vegetal (fonte enzimática) gerando sensibilidade e seletividade. Além

destas vantagens apresentam baixo custo, simplicidade de instrumentação e construção, entre outras. Na construção de biossensores amperométricos geralmente são utilizadas enzimas da classe das oxiredutases, que empregam peróxido hidrogênio como acceptor de elétrons. Pois estes biossensores são capazes de monitorar reações de oxidação/redução e o sinal elétrico gerado é proporcional a concentração do analito. Os biossensores amperométricos apresentam diversas vantagens, entre elas a sensibilidade, seletividade, baixo custo de construção, entre outras^{88,89}.

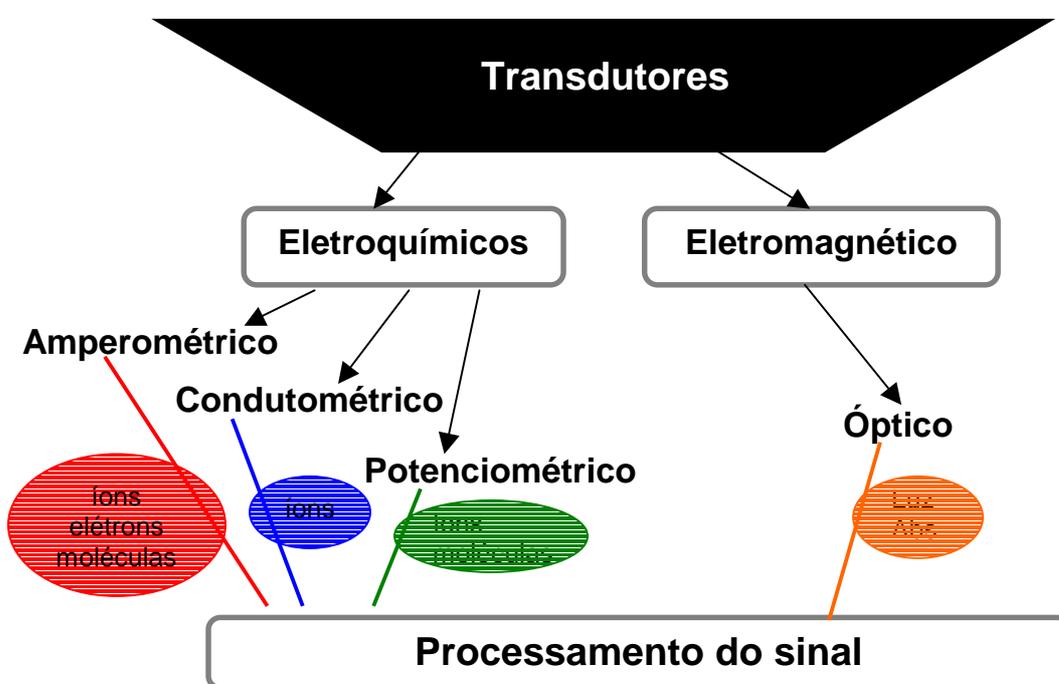


Figura 8. Esquema dos transdutores mais utilizados e a grandeza física que cada transdutor detecta.

As etapas de funcionamento do biossensor baseiam-se na interação seletiva do analito da amostra com o material biológico (bioreceptor) imobilizado na

superfície do sensor. Posteriormente, ocorre a detecção, por parte do transdutor, devido à variação de alguma propriedade física ou química do sistema, provocada pela reação de reconhecimento seletivo e finalmente o processamento do sinal e obtenção dos resultados^{43,44,49,90}.

O uso do material biológico adequado na construção de biossensores para um determinado analito de interesse, resulta em sensores altamente seletivos e sensíveis e pode apresentar diversas vantagens em relação aos eletrodos convencionais, tais como: aumento da sensibilidade, seletividade e estabilidade, diminuição do limite de detecção do procedimento, baixo custo e facilidade na construção, resposta rápida, potencial para miniaturização e construção de equipamentos simples e portáteis^{43,44,49,52,54,88,90}.

O eletrodo de pasta de carbono proposto por Adams em 1958, foi construído na tentativa de obter um eletrodo de carbono renovável para ser utilizado em uma ampla faixa de potenciais positivos, em que o eletrodo de mercúrio não é aplicável devido à sua oxidação. Desde então, é uma ferramenta muito empregada na construção de biossensores. É composto de pó de grafite e de um aglutinante imiscível em solução aquosa⁹¹. O pó de grafite deve possuir tamanho uniforme, alta pureza química e baixa capacidade de adsorção de impurezas. O aglutinante é geralmente um líquido orgânico quimicamente inerte, de baixa volatilidade, livre de impurezas, eletroinativo. Esse eletrodo oferece versatilidade, baixo custo, baixa corrente de fundo, modificação conveniente e facilidade de renovação da superfície, ampla faixa de potencial de trabalho, facilidade de construção e possibilita a modificação interna do material eletródico, diferentemente do que ocorre com os eletrodos convencionais, em que a modificação ocorre apenas na superfície⁹²⁻⁹⁴.

Pereira e Kubota⁹⁵ aperfeiçoaram um eletrodo de pasta de carbono contendo riboflavina imobilizada em sílica modificada com óxido de nióbio, em que um

planejamento fatorial foi aplicado para averiguar e otimizar a preparação deste eletrodo. Foi possível concluir que o fator proporção e a interação proporção/mistura são estatisticamente significativos e a melhor proporção foi definida como: 60/40 (% m/m) de modificador/pó grafite e posterior adição do aglutinante (óleo mineral).

1.3.2 Extrato de vegetais (homogenato) – Fonte enzimática

O uso de tecidos e extrato de vegetais, como fonte de enzimas na construção de biossensores, tem se tornado freqüente devido à simplicidade e à facilidade de obtenção da enzima, baixo custo do processo e alta atividade enzimática. A enzima é mantida no seu ambiente natural resultando em maior estabilidade e tempo de vida superior àqueles métodos que utilizam enzimas purificadas. Além da simplicidade e facilidade na construção do biossensor empregando estas enzimas, existe também a vantagem dos cofatores naturais presentes nos vegetais, não necessitando adicioná-los durante a imobilização da enzima^{52,96-104}. No entanto, uma desvantagem ao empregar tecido e extrato de vegetais como fonte enzimática na construção de biossensores pode muitas vezes causar uma diminuição da seletividade quando comparados com biossensores que empregam enzimas purificadas, devido a presença de uma multiplicidade de enzimas⁸⁸.

O primeiro trabalho analítico usando extrato de tecidos vegetais foi desenvolvido por Uchiyama e colaboradores, publicado em 1988. Esses autores utilizaram extrato de pepino (fonte da enzima *ascorbato oxidase*) em um sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de ácido ascórbico¹⁰⁵.

Em 1994, Signori e Fatibello-Filho¹⁰⁶ desenvolveram o primeiro biossensor amperométrico utilizando extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorhiza*) como fonte enzimática da polifenol oxidase. A enzima foi imobilizada com glutaraldeído em uma

membrana de acetato de celulose e afixada em um eletodo de oxigênio e posteriormente otimizado e empregado na determinação de compostos fenólicos em águas residuárias indústrias. O biossensor apresentou uma resposta linear para pirogalol, catecol, fenol e p-cresol nas faixas de concentrações de $2,5 \times 10^{-5}$ a $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; $1,0 \times 10^{-5}$ a $8,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; $1,0 \times 10^{-5}$ a $9,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, respectivamente. O biossensor foi estável durante duas semanas com aproximadamente 300 determinações por membrana.

Oliveira e outros⁶⁵ construíram um biossensor de pasta de carbono, imobilizando a peroxidase obtida do gengibre (*Zingiber officinalis* Rosc.) em matriz de quitosana previamente reticulada com glutaraldeído para determinação de hidroquinona em água obtida de processo de revelação fotográfica. O biossensor apresentou linearidade para hidroquinona de $2,5 \times 10^{-4}$ a $2,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $2,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Lupetti e outros⁹⁶ desenvolveram um biossensor de pasta de carbono usando extrato enzimático de abobrinha (*Cucurbita pepo*) para determinação de dopamina em formulações farmacêuticas. O eletrodo enzimático apresentou um limite de detecção de $2,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e linearidade de $5,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

Recentemente, Oliveira e Vieira⁹⁷ utilizaram a quitosana como suporte sólido e imobilizaram a enzima peroxidase de jiló (*Solanum gilo*) e construíram biossensores de pasta de carbono para determinação de hidroquinona. A peroxidase foi imobilizada na quitosana por três procedimentos: adsorção, grupos hidroxila ativados com carbodiimida, grupos hidroxila ativados com carbodiimida e grupos amino reticulados com glutaraldeído. O biossensor apresentou melhor desempenho com a quitosana ativada e reticulada com carbodiimida/glutaraldeído, apresentando

uma linearidade para hidroquinona de $2,5 \times 10^{-4}$ a $5,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Vieira e Fatibello-Filho⁹⁸ desenvolveram um biossensor de grafite/parafina modificado com tecido de batata doce (*Ipomoea batatas (L.) Lam.*) como fonte da enzima peroxidase. Alguns parâmetros foram estudados em meio não aquoso para obtenção da melhor resposta do biossensor e posterior aplicação na determinação de hidroquinona em cosméticos. O biossensor apresentou resposta linear para hidroquinona de $7,5 \times 10^{-5}$ a $1,6 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e limite de detecção de $8,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Fatibello-Filho e colaboradores⁹⁹ utilizaram abacate (*Persea americana*) como fonte da enzima polifenol oxidase na construção de biossensor de pasta de carbono para determinação cronoamperométrica de paracetamol em formulações farmacêuticas. O biossensor apresentou uma faixa linear de $1,2 \times 10^{-4}$ a $5,8 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de paracetamol com limite de detecção de $8,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Leite e colaboradores¹⁰¹ desenvolveram um biossensor de pasta de carbono usando a enzima lacase (*pleurofus ostreatus*) e a peroxidase de abobrinha (*Cucurbita pepo*). Após otimização do eletrodo bi-enzimático, foi avaliado o efeito sinérgico das duas enzimas sobre a resposta do biossensor para várias catecolaminas e o resultado comparado com o estudo espectrofotométrico.

Vieira e colaboradores¹⁰³ desenvolveram um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato de abobrinha (*Cucurbita pepo*) fonte de enzima peroxidase e grafite contendo paládio, para determinação de hidroquinona em água obtida de processo de revelação fotográfica. O biossensor apresentou uma linearidade de $6,2 \times 10^{-5}$ a $8,9 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $8,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Recentemente¹⁰⁴, extrato de jiló (*Solanum gilo*) foi utilizado como fonte da enzima peroxidase. A enzima foi imobilizada em matriz de quitosana previamente

reticulada com epícloridrina/glutaraldeído e incorporada a pasta de carbono. O biossensor apresentou linearidade para de rutina de $3,4 \times 10^{-7}$ a $7,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $7,2 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

Caruso e colaboradores¹⁰⁷ desenvolveram um biossensor de pasta de carbono usando extrato de cara (*Dioscorea bulbifera*), sensível a catecol, dopamina e adrenalina.

Leite e colaboradores¹⁰⁸ construíram e otimizaram um biossensor empregando lacase (*Pleurotus ostreatus*). O biossensor proposto foi empregado na determinação de adrenalina e dopamina em formulações farmacêuticas, obtendo-se uma linearidade $6,0 \times 10^{-5}$ a $7,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para adrenalina e $7,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para dopamina, com limites de detecção de $7,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $9,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente.

Fatibello-Filho e Vieira¹⁰⁹ desenvolveram um biossensor de pasta de carbono/ácido esteárico modificado com tecido de batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) para determinação de hidroquinona em meio não aquoso. Vários parâmetros foram estudados para a obtenção da melhor resposta do biossensor, obtendo-se uma linearidade de $6,2 \times 10^{-5}$ a $1,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de hidroquinona e limite de detecção de $8,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Vieira e colaboradores¹¹⁰ estudaram a atividade enzimática e o tempo de armazenamento da peroxidase obtida do extrato de diversos vegetais. A peroxidase obtida da abobrinha (*Cucurbita pepo*) apresentou maior atividade enzimática e maior estabilidade, sendo selecionado este vegetal para a construção de biossensor de pasta de carbono para determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos. O biossensor apresentou uma linearidade para paracetamol de $1,2 \times 10^{-4}$ a $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e limite de detecção de $6,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

1.3.3 Biossensores e nanotecnologia

Nanopartículas vêm sendo amplamente utilizadas na adsorção de biomoléculas devido a grande área superficial e por facilitar a transferência de elétrons do material biológico para a superfície do eletrodo, resultando no bom desempenho do sensor. Ren e outros¹¹¹ imobilizaram a peroxidase (HRP) sobre um eletrodo de ouro modificado com nanopartículas de prata. As nanopartículas de prata foram imobilizadas em cisteamina sobre o eletrodo de ouro e posteriormente a enzima foi adsorvida na superfície das nanopartículas. O biossensor apresentou uma faixa linear de $3,3 \times 10^{-6}$ a $9,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio e limite de detecção de $0,78 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Yao e outros¹¹² prepararam um nanocompósito de sílica/azul de metileno, material usado como mediador de elétrons na construção do biossensor contendo peroxidase (HRP) co-imobilizada em matriz de gelatina reticulada com formaldeído. A gelatina contendo o nanocompósito e a enzima foi depositada na superfície de um eletrodo de carbono vítreo e utilizada na determinação de H₂O₂. O biossensor apresentou rápida resposta amperométrica e boa estabilidade na determinação de H₂O₂, em uma faixa linear de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $4,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Yuan e outros¹¹³ construíram um biossensor baseado na imobilização da peroxidase (HRP) em polivinil butiral (PVB-polímero usado na blindagem de vidros) e nanopartículas de prata. Este material foi depositado na superfície de um eletrodo de platina e apresentou linearidade na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ para H₂O₂ com limite de detecção de $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Di e outros¹¹⁴ desenvolveram um biossensor com nanopartículas de ouro e a enzima peroxidase (HRP) foi imobilizada em sílica-gel sobre eletrodo de ouro em

presença de cisteína. O biossensor apresentou uma excelente resposta catalítica para redução de H_2O_2 na ausência de mediador de elétrons apresentando linearidade de $1,6 \times 10^{-6}$ a $3,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e limite de detecção de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para H_2O_2 .

Xu e outros¹¹⁵ utilizaram uma solução de sílica-gel contendo nanopartículas de prata, mediador azul de metileno, enzima peroxidase (HRP) e depositaram este material na superfície de um eletrodo de carbono. O biossensor apresentou uma faixa linear de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para H_2O_2 com limite de detecção de $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Liu e outros¹¹⁶ imobilizaram a peroxidase (HRP) em um compósito inorgânico/orgânico (nanopartículas de ZnO/quitosana) para construção de um biossensor sensível a H_2O_2 . O biossensor apresentou alta reprodutibilidade e estabilidade e resposta linear no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ H_2O_2 com limite de detecção de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Yang e Zhu¹¹⁷ desenvolveram um biossensor para determinação de glicose, usando a enzima glicose oxidase adsorvida em nanopartículas de SiO_2 . O biossensor desenvolvido apresentou uma linearidade de $5,0 \times 10^{-6}$ a $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glicose em tampão fosfato pH 7,2 e limite de detecção de $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Nanotubos possuem excelente condutividade elétrica, resistência mecânica e ao mesmo tempo, flexibilidade e elasticidade. São características que os credenciam a uma infinidade de aplicações importantes em ciência e tecnologia. Desde 1996, tem sido utilizado na construção de sensores e apresentam velocidade de reação, reversibilidade e limite de detecção superior aos eletrodos de pasta de carbono convencionais¹¹⁸⁻¹²⁰. Além disso, o uso de nanotubos de carbono pode diminuir a sobrevoltagem de substâncias redox, é considerado um excelente suporte para imobilização de enzimas devido a grande área superficial, mantém a atividade

catalítica da enzima durante mais tempo e promove a transferência direta de elétrons da enzima para a superfície do eletrodo¹²¹⁻¹²³. Recentemente, Li e outros¹²², desenvolveram um biossensor para o monitoramento de colesterol no sangue. A construção do sensor combinou as enzimas colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase, ferrocianeto de potássio e nanotubos de carbono imobilizados sobre eletrodo de pasta de carbono. O biossensor apresentou uma linearidade de 100 a 400 mg dL⁻¹ para colesterol e ótima correlação entre os dados obtidos pelos métodos empregados em laboratórios clínicos. Apresentou facilidade na construção do biossensor, estabilidade e rapidez no monitoramento de colesterol em sangue. Jia e outros¹²³ desenvolveram um biossensor com a enzima glicose oxidase adsorvida na superfície de nanotubos de carbono modificados com átomos de nitrogênio. Os resultados obtidos sugerem que os nanotubos de carbono modificados com átomos de nitrogênio não somente facilitam a transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo como também ajudam a manter a atividade catalítica.

1.3.4 Química biomimética de enzimas artificiais

As enzimas são estruturas complexas encontradas em organismos vivos, que possuem grupos catalíticos e muitas vezes necessitam de cofatores específicos ou coenzimas para desempenhar a catálise bioquímica. Esta catálise enzimática altamente efetiva e específica tem incentivado diversos pesquisadores a buscar sintetizar modelos e análogos sintéticos que mimetizam o sítio ativo de enzimas. Cabe ressaltar que a idéia do uso de enzimas artificiais e sensores biomiméticos não está somente relacionada em mimetizar a estrutura de enzimas naturais, mas também com compostos capazes de realizar catálises de algum tipo

de reação. Portanto, parte da química biomimética baseia-se na síntese de compostos modelo e a partir das informações sobre propriedades físico-químicas e estruturais do sítio catalítico da enzima natural, inicia-se o processo do desenvolvimento de compostos orgânicos (ligantes) com funções químicas semelhantes aos resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico da enzima natural. A comparação das propriedades estruturais, físico-químicas e catalíticas dos compostos de coordenação sintéticos com as metaloenzimas de interesse, permite caracterizar um bom modelo sintético para uma determinada enzima. As metaloenzimas possuem em sua estrutura química íons metálicos, mais comumente íons de transição, tais como: Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Co^{2+} , que geralmente participam dos processos catalíticos. O centro ativo das metaloenzimas pode ser homonuclear, binuclear e heteronuclear e geralmente apresentam uma ou mais pontes do tipo oxo, hidroxido, carboxilato ou imidazólico ligando os metais¹²⁴.

Neves e colaboradores¹²⁵⁻¹²⁸ sintetizam e caracterizam compostos de baixa massa molar, que modelam características estruturais e/ou funcionais de vários sistemas biológicos. Estudaram as propriedades estruturais, eletroquímicas, espectroscópicas e a reatividade desses compostos, buscando correlacioná-los àquelas apresentadas pelas enzimas naturais. Estes compostos podem ser utilizados na construção de sensores altamente sensíveis e estáveis para o monitoramento de diversos compostos.

1.3.4.1 Sensores biomiméticos

Sensores biomiméticos ou ainda *enzymeless biosensors*, baseiam-se no uso de análogos sintéticos de enzimas naturais na construção de sensores que fazem

parte da terceira geração de sensores, nos quais possivelmente ocorra uma transferência direta de elétrons do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo, sem a necessidade de compostos mediadores de elétrons¹²⁹.

O desenvolvimento de sensores biomiméticos pode ser considerado como um campo de pesquisa relativamente novo, desta forma a literatura a respeito é incipiente. Entretanto, os poucos trabalhos relatados na literatura, procuram demonstrar que sintetizando e caracterizando adequadamente compostos inorgânicos simples e/ou complexos de metais de transição são capazes de catalizar substratos de forma semelhante à enzima correspondente, possibilitando desta forma a construção de sensores biomiméticos com alta seletividade e sensibilidade.

Lotzbeyer e colaboradores^{130,131} desenvolveram biossensores utilizando enzimas sem a camada protetora de proteínas ao redor do sítio ativo e obtiveram uma transferência eficiente de elétrons sem perder a seletividade e ao mesmo tempo aumentando a sensibilidade dos sensores. Inicialmente compararam a enzima HRP (*horseradish peroxidase*) com a mini-enzima MP-11 (micro peroxidase 11), concluíram que a imobilização de mini-enzimas pode aumentar a concentração de sítios ativos na superfície do eletrodo, permitindo uma aproximação maior do sítio ativo da enzima para o eletrodo promovendo um aumento na transferência eletrônica entre 'eletrodo-sítio ativo-substrato' aumentando a sensibilidade e em muitos casos a estabilidade do sistema.

Sotomayor e colaboradores¹³² utilizaram o complexo mononuclear de Cu(II) [CuDipyCl₂] como catalisador biomimético na construção de um sensor para determinação de dopamina. O sensor foi preparado modificando o eletrodo de carbono vítreo com uma membrana de Nafion contendo [CuDipidiryCl₂]. O sensor

apresentou resposta linear para dopamina de $4,0 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e limite de detecção de $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Sotomayor e colaboradores¹³³, empregaram o complexo [Cu(bipiridil)₃Cl₂.6H₂O] modelo da enzima tirosinase na construção de um sensor biomimético para determinação de dopamina em formulações farmacêuticas. O sensor foi preparado modificando um eletrodo de carbono vítreo com membrana de Nafion contendo o complexo de Cu(II) sintetizado. O biossensor foi otimizado e apresentou resposta linear na concentração de dopamina de 9 a 230 μmol L⁻¹ e limite de detecção de 4,8 μmol L⁻¹. Apresentou resposta para aproximadamente 150 determinações, boa repetibilidade e desvio padrão de 4,8 % mantendo a sensibilidade num período de tempo de 180 dias com perda de resposta de 4,2 %.

No trabalho desenvolvido por Hasebe e colaboradores¹³⁴, foi usado um complexo de poli-histidina de cobre, como espécie catalizadora, na construção do sensor biomimético para determinação de ascorbato. O sensor apresentou uma resposta segundo cinética de Michaelis-Menten, confirmando a catálise do complexo de poli-histidina de cobre pelo substrato ascorbato, simulando desta forma a enzima ascorbato oxidase. O sensor apresentou linearidade de $3,0 \times 10^{-6}$ a $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ascorbato com limite de detecção de $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e estabilidade de três meses, (aproximadamente 300 determinações) com pequena perda de atividade.

Berchamans e colaboradores¹³⁵ desenvolveram um sensor biomimético de pasta de carbono modificado com Ni(OH)₂/NiOOH, usado como catalisador, na determinação de glicose, ácido ascórbico, peróxido de hidrogênio, com linearidade de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-2}$, $0,6 \times 10^{-3}$ a $3,96 \times 10^{-3}$; $0,13 \times 10^{-3}$ a $0,65 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, respectivamente. O sensor apresentou um preparo simples e um período de resposta de 120 dias.

Com base nos trabalhos relatados na literatura, pode-se confirmar que sistemas enzimáticos, no caso particular das metaloenzimas, podem ser substituídos satisfatoriamente por moléculas menores, contendo metais que participam do sítio catalítico da enzima mimetizada e quando utilizados em sensores biomiméticos, podem atuar como catalisadores de diversos substratos.

1.4 SUBSTRATOS

1.4.1 Hidroquinona

A hidroquinona, (1,4 benzenodiol) obtida pela primeira vez em 1820 por Pelletier e Caventou, tem sido facilmente sintetizada através da oxidação da anilina, redução de quinona e ainda obtida pela oxidação de fenol com persulfato. É encontrada naturalmente em pequenas quantidades em produtos como trigo, café, chá, frutas, vários vegetais e em bebidas como vinho tinto e cerveja^{136,137}.

Em cosméticos a hidroquinona atua como agente de despigmentação da pele (removendo manchas). É disponível em formulações de creme, loção e gel em concentrações de 2 a 5 %, com e sem protetor solar. Concentrações de 3 a 4 % podem produzir bons resultados como clareador da pele. No entanto, o uso prolongado e em quantidades superiores a 4 %, a hidroquinona pode causar coceira, dermatites e eritema, mudanças na coloração da pele, em indivíduos especialmente com pele sensível^{137,138}.

Diversos procedimentos são descritos na literatura para determinação de hidroquinona em revelador fotográfico e creme dermatológico, entre eles, os cromatográficos^{136,138,139}, espectrofotométricos^{140,141} e eletroanalíticos^{65,97,102,142}.

1.4.2 Rutina

Os flavonóides são compostos fenólicos derivados de 2-fenil-benzopirano ($C_{6}C_3C_6$), formado por dois anéis aromáticos ligados entre si por uma cadeia de três átomos de carbono. A Figura 9 mostra o núcleo fundamental dos flavonóides e a numeração dos átomos de carbono de cada anel^{143,144}.

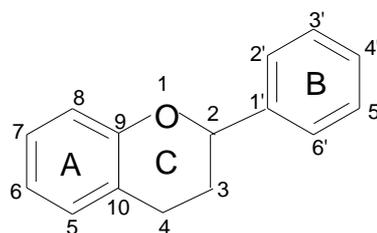


Figura 9. Estrutura fundamental dos flavonóides.

Os flavonóides podem ser classificados em diferentes classes, dentre as quais se destacam flavonas, flavononas, flavonóis, flavanonóis, flavan-3-óis, isoflavonas e antocianidinas, que diferem entre si pelo número e pela posição dos grupos substituintes nos anéis A, B e C, além da presença ou ausência da dupla ligação e carbonila no anel C. São amplamente distribuídos em plantas e muito conhecidos por apresentarem propriedades antioxidantes. Essa atividade antioxidante está relacionada à capacidade de estabilização e/ou doação de elétrons e formação de quelatos com metais de transição. Na natureza podem ser encontrados em folhas, flores, frutas, sementes, grãos, plantas medicinais e ainda em bebidas como chá, vinho e cerveja^{143,144}.

Atualmente os flavonóides têm sido objetos de pesquisa devido as suas já comprovadas atividades dentro da química biomédica. A atividade antiinflamatória,

analgésica, antialérgica, antiviral, anticarcinogênica e antioxidante são alguns exemplos da importância farmacológica destes metabólitos naturais^{143,144}.

A rutina, estrutura química ilustrada na Figura 10, é um derivado de flavona. Como resultado da atividade farmacológica a rutina tem sido empregada em diversos fármacos com efeito antiinflamatório, antitumor, antialérgico, antiviral, entre outras propriedades¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

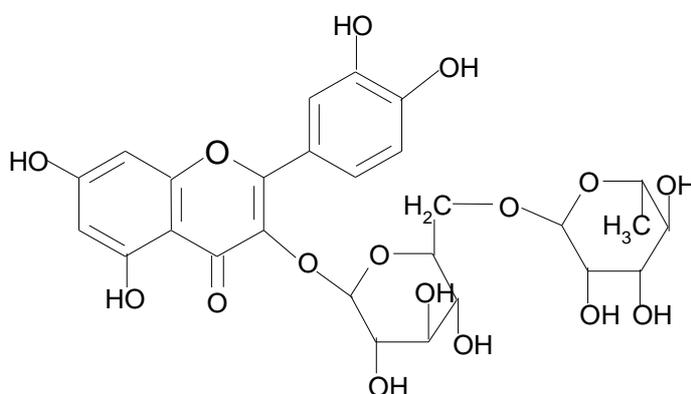


Figura 10. Estrutura química da rutina.

Diversos procedimentos são empregados para determinação de rutina, entre eles os métodos espectrofotométricos¹⁴⁸⁻¹⁵⁰, eletroforese capilar^{151,152} e os eletroquímicos¹⁵³⁻¹⁵⁵. Os métodos espectrofotométricos têm sido usados para determinação individual de rutina e também simultânea de outros flavonóides¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. A metodologia empregando eletroforese capilar com detecção eletroquímica¹⁵³ obteve uma resposta linear para rutina de $1,9 \times 10^{-5}$ a $4,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Os métodos eletroquímicos e biossensores apresentaram bons resultados para determinação de flavonóides em produtos farmacêuticos^{154,155}.

1.4.3 Dopamina

A dopamina é um neurotransmissor, precursor metabólico da noroadrenalina e da adrenalina. Atua em receptores específicos presentes no sistema nervoso central, nos vasos mesentéricos e coronárias. É utilizada para o tratamento de diversos tipos de choque e da hipotensão grave após infarto agudo do miocárdio, dilatando os vasos sanguíneos renais e aumentando dessa forma o fluxo sanguíneo^{30,107}.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a determinação desta substância, como os cromatográficos^{156,157}, espectrofotométricos^{158,159} e eletroquímicos¹⁶⁰⁻¹⁶². Os eletroquímicos têm sido muito utilizados por apresentar sensibilidade e seletividade na determinação de vários analitos. Estes métodos geralmente não necessitam de pré-purificação e conseqüentemente reduzem o custo das análises¹⁶⁰⁻¹⁶².

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e aplicar novos biossensores e sensores biomiméticos para determinação de compostos fenólicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Biossensores

- ✓ Selecionar diferentes vegetais, obter a enzima peroxidase, determinar a atividade, proteína total e atividade específica;
- ✓ Determinar o grau de desacetilação da quitosana;
- ✓ Estudar o tempo de reticulação da quitosana com glutaraldeído;
- ✓ Reticular e ativar os grupos funcionais da quitosana por três procedimentos diferentes:
 - (I) grupos amino reticulados com glutaraldeído;
 - (II) grupos amino reticulados com glutaraldeído e os grupos hidroxila ativados com carbodiimida;
 - (III) grupos amino e hidroxila reticulados com glutaraldeído e epícloridrina, respectivamente;
- ✓ Após a ativação e reticulação da quitosana, imobilizar a enzima peroxidase de vegetal e construir biossensores de pasta de carbono;
- ✓ Otimizar os três biossensores utilizando as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada para investigar parâmetros, tais como: pH, concentração da enzima, frequência, amplitude de potencial;

- ✓ Após a otimização, comparar o desempenho dos biossensores desenvolvidos e utilizar na determinação de hidroquinona em águas obtidas nos processos de revelação fotográfica e de raios-X;
- ✓ Empregar o biossensor que apresentou melhor resposta para determinação de rutina em fármacos. Comparar os resultados com aqueles obtidos para a hidroquinona.
- ✓ Determinar o teor de hidroquinona e rutina nas amostras selecionadas empregando o método oficial^{163,164}.

2.2.2 Sensores biomiméticos

- ✓ Utilizar os complexos de Cu^{II} modelo catecol oxidase e de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ modelo fosfatase ácida púrpura na construção de sensores biomiméticos;
- ✓ Otimizar os sensores biomiméticos utilizando as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada e investigar o melhor pH de determinação, porcentagem do complexo/pasta de carbono, substratos, concentração de peróxido de hidrogênio, frequência, amplitude de potencial.
- ✓ Avaliar o desempenho do sensor biomimético construído a partir do complexo de Cu^{II} na determinação de hidroquinona em cosméticos.
- ✓ Investigar a resposta do sensor contendo complexo $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ para compostos fenólicos em presença de peróxido de hidrogênio. Otimizar e aplicar o sensor biomimético para determinação de dopamina em produtos farmacêuticos.
- ✓ Empregar o método oficial para determinação de hidroquinona¹⁶³ em cosméticos e dopamina¹⁰⁷ em fármacos e comparar os valores obtidos com aqueles empregando o método proposto para cada substrato.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo estão descritos todos os equipamentos, eletrodos, reagentes, soluções e procedimentos experimentais usados para a construção e aplicação dos biossensores e dos sensores biomiméticos.

3.1 EQUIPAMENTOS E ELETRODOS

O extrato enzimático foi obtido, homogeneizando-se o vegetal selecionado em um liquidificador Black & Decker modelo IB900. Efetuou-se a centrifugação do material biológico em uma centrífuga Hitachi modelo Himac CR 20B2.

As medidas espectrofotométricas, para a determinação da atividade e proteína total da enzima peroxidase, foram obtidas empregando um espectrofotômetro Femto modelo 434, utilizando uma cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho ótico.

Os espectros na região do infravermelho da quitosana foram obtidos usando um espectrofotômetro FT Perkin Elmer, modelo 16 PC. As titulações condutométricas foram realizadas, empregando-se um condutivímetro da Micronal, modelo B330 e um titulador automático Schott Geräte, modelo T 80/20.

O grau de desacetilação da quitosana foi determinado usando um condutivímetro Mettler Toledo, modelo MC 226 e titulador automático Schott Geräte, modelo T80/20.

Os eletrodos de trabalho utilizados foram os biossensores, construídos a partir dos três procedimentos de imobilização da peroxidase na matriz de quitosana e o sensor biomimético. O contra-eletródo usado foi de platina com área de 0,5 cm x 1,0 cm e o de referência de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl), com solução interna de

KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$, separada da solução de trabalho por uma placa porosa ultra fina de vycor.

As medidas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada foram obtidas utilizando-se um potenciostato/galvanostato da Autolab modelo PGSTAT12 usando uma célula de vidro, sem compartimento divisório, com capacidade aproximada de 15 mL, com tampa de Teflon com orifícios circulares para encaixe dos eletrodos e adição das soluções.

3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Reagentes de grau analítico foram usados para preparar soluções tampão e soluções padrão diariamente.

Quitosana em pó (Aldrich) foi usada como suporte para imobilizar a enzima peroxidase.

Foi preparado tampão acetato (pH 4,0; 5,0), tampão fosfato (pH 6,0; 7,0; 8,0), tampão tris-hidroximetil amino metano (pH 9,0; 10,0) em concentrações de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck).

Solução de guaiacol $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ usada para determinação da atividade da peroxidase, foi preparada pela diluição de 0,56 mL deste reagente (Merck) em um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

Solução de peróxido de hidrogênio $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 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 7,0). Após padronização¹⁶⁶ foi retirado uma alíquota de 1,0 mL e novamente diluído em um balão volumétrico de 100 mL com tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

Utilizou-se o método do biureto na determinação de proteína total do extrato enzimático dos tecidos vegetais. Este reagente foi preparado, dissolvendo-se 1,5 g de sulfato de cobre II (Merck) e 6,0 g de tartarato de sódio e potássio (Merck) em 500 mL de água destilada. Adicionaram-se, sob agitação, 300 mL de hidróxido de sódio (Merck) 10% (m/v) e transferiu-se este volume para um balão volumétrico de 1000 mL, completando-se o volume com água destilada.

A solução de albumina de soro bovino (Aldrich) 10,0 mg/mL foi preparada em água destilada e usada como padrão na construção da curva analítica para determinação de proteína total no extrato dos vegetais.

Solução de glutaraldeído (Vetec) 2,5% (v/v) usada para reticular os grupos amina da quitosana foi preparada diluindo-se 10,0 mL de glutaraldeído 25 % (v/v) em um balão volumétrico de 100 mL e completando-se o volume com água destilada.

Solução estoque de carbodiimida (Aldrich) $6,2 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ utilizada na reticulação dos grupos hidroxila da quitosana foi obtida a partir da dissolução de 0,0130 g de carbodiimida e completado o volume para 10,0 mL com água destilada.

Solução estoque de epicloridrina (Vetec) 0,10 mol L⁻¹ empregada para reticular os grupos hidroxila da quitosana foi obtida diluindo-se 78,00 mL de epicloridrina 99 % (v/v) para um balão de 10 mL e completando-se o volume com água destilada.

Solução estoque de hidroquinona (Aldrich) 0,05 mol L⁻¹ foi obtida dissolvendo-se 0,2753 g deste reagente em balão volumétrico com capacidade de 50 mL e completando-se o volume com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

Solução estoque de rutina (Merck) 0,05 mol L⁻¹ foi preparada a partir da dissolução de 0,7632 g de rutina em 25,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

Para a construção dos biossensores foi utilizado pó de grafite (Acheson-38) e Nujol (Aldrich).

As soluções de metildopa, L-dopa, dopamina e catecol $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (Sigma), foram preparadas a partir das dissoluções de 0,5956; 0,4931; 0,4741 e 0,2753 g, respectivamente, em balões volumétricos de 50,0 mL e os volumes completados com tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

Foram determinados os teores de hidroquinona em amostras de água do processo de revelação fotográfico e de raios-X, obtidas no comércio e no Hospital Universitário, respectivamente, da cidade de Florianópolis, SC.

O biossensor que apresentou melhor resposta para hidroquinona foi usado na determinação de rutina em fármacos. Duas amostras contendo rutina foram analisadas (Nova rutina e rutina manipulada), estes produtos farmacêuticos foram adquiridos em farmácias de Florianópolis, SC.

Foram determinados os teores de hidroquinona em cosméticos empregando o sensor biomimético contendo complexo binuclear de CuII. As amostras foram adquiridas em farmácia de manipulação da cidade de Florianópolis, SC.

O teor de dopamina em fármacos foi quantificado usando o sensor biomimético contendo complexo FeII/FeIII. As amostras (ampola contendo 5 mg mL^{-1} de dopamina) foram doadas pela farmácia do Hospital Universitário de Florianópolis, SC.

3.3 BIOSSENSORES

3.3.1 Obtenção do extrato enzimático (homogenato)

Os vegetais (abacaxi, acelga, bata-salsa, fruta-de-conde, gengibre, goiaba jiló e mandioca) foram adquiridos em supermercados de Florianópolis e o homogenato utilizado como fonte enzimática na construção de biossensores. Após lavagem e secagem, 25 g de vegetal descascado, foram picados e homogeneizados em um liquidificador, com 100 mL de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Em seguida, este foi filtrado em 4 camadas de gaze e centrifugado a 25.000 xg , 18.000 rpm , durante 5 min, a 4°C . A solução sobrenadante foi dividida em diversas alíquotas, armazenadas em refrigerador a 4°C , e usadas como fonte da enzima peroxidase para a construção dos biossensores.

3.3.2 Determinação da atividade enzimática

Todas as soluções usadas para determinar a atividade enzimática no extrato dos vegetais foram preparadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. A atividade da peroxidase foi determinada a partir de 0,2 mL da solução sobrenadante do extrato enzimático, 2,7 mL de guaiacol $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e 0,1 mL de peróxido de hidrogênio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Após a homogeneização dessas soluções, foi acompanhada a absorvância do tetraguaiacol formado na reação enzimática em 470 nm, durante 2 minutos¹⁶⁶.

A atividade enzimática – unidades mL^{-1} (U/mL) - definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorvância por minuto, foi determinada pela equação 1⁹⁶⁻¹⁰⁴.

$$A \text{ (U/mL)} = \frac{\Delta\text{Abs.}1000}{\Delta t. V} \quad \text{Equação (1)}$$

A = atividade da enzima em (U/mL)

ΔAbs = Variação da absorbância (470 nm)

V = Volume do homogenato (mL)

Δt = Variação do tempo (s)

3.3.3 Determinação da proteína total

O teor de proteína total do homogenato foi determinado empregando albumina de soro bovino (BSA) como padrão¹⁶⁸. A curva analítica foi construída a partir de 8,0 mL do reagente de biureto, variando volumes de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,6; e 2,0 mL de BSA e completando o volume para 10,0 mL com água destilada.

Utilizando 1,0 mL do extrato dos vegetais e 4,0 mL da solução de biureto, após homogeneização destas soluções e repouso durante 30 minutos, as leituras foram feitas em 546 nm. A atividade específica (U/ mg de proteína) foi calculada pela razão da atividade da enzima (U/mL) e o teor de proteína total (mg/mL).

3.3.4 Estudo do tempo de reticulação da quitosana com glutaraldeído

O estudo do tempo de reação para a reticulação da quitosana com glutaraldeído foi de 10 min a 24 horas. Foram preparadas seis amostras contendo 2,0 g de pó de quitosana e 30,0 mL de solução de glutaraldeído 2,5% (v/v). As amostras foram, respectivamente, agitadas por 10, 30, 60, 300, 600 e 1440 minutos, a 25 °C. Após o término do tempo de reação para cada amostra, efetuou-se a centrifugação, descartando-se o sobrenadante e as amostras de quitosana reticuladas com glutaraldeído foram lavadas com água destilada para remover o excesso de reagente, seca com acetona e armazenada a temperatura ambiente.

3.3.5 Determinação do grau de desacetilação da quitosana (% GD)

O % GD da quitosana pura e reticulada foi determinado por titulação condutométrica usando o método de Broussignac¹⁶⁹. Uma alíquota de 20,0 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ foi adicionada a 0,2 g de pó de quitosana, agitada durante 30 min, a 25 °C. Em seguida, a solução foi titulada condutometricamente com hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ até o volume final de 25 mL, com adições de 0,2 mL de titulante a cada medida e em seguida a porcentagem de grupos amino livres na quitosana foi determinada pela equação 2. O mesmo procedimento foi seguido para determinação do percentual de grupos amino livres nas amostras de quitosana reticulada.

$$\% \text{ GD} = \frac{M(V_2 - V_1)161}{W} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

M = concentração de NaOH (mol L^{-1})

V_1 = volume NaOH adicionado até o primeiro ponto de equivalência

V_2 = volume NaOH adicionado até o segundo ponto de equivalência

W = massa da amostra (g)

161 = massa molar (g mol^{-1}) de uma unidade monomérica da quitosana.

3.3.6 Reticulação da quitosana e imobilização da peroxidase

Foram desenvolvidos três procedimentos para imobilização da enzima peroxidase na matriz de quitosana. Após as imobilizações, esses materiais foram utilizados na construção dos biossensores.

3.3.6.1 Reticulação dos grupos amino da quitosana com glutaraldeído (I).

Reticulou-se 1,0 g de quitosana com 30,0 mL de solução de glutaraldeído 2,5% (v/v), em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, por 30 min sob agitação. Em seguida, a quitosana foi lavada com solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, para eliminar o excesso de glutaraldeído, seca com acetona e armazenada a 25°C .

3.3.6.2 Reticulação dos grupos amino e ativação das hidroxilas com glutaraldeído-carbodiimida (II).

À quitosana foi inicialmente reticulada com glutaraldeído, como descrito no procedimento anterior. Alíquota de 30,0 mL de solução de carbodiimida (EDC – 1-

etil-3-dimetil-aminopropil) $3,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, preparada em solução tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, foi adicionada à quitosana pulverizada, e, após 30 min, lavou-se com solução tampão de fosfato, pH 7,0, para remover o excesso de carbodiimida.

3.3.6.3 Reticulação dos grupos amino e hidroxila da quitosana com glutaraldeído e epiclоридrina (III).

A quitosana, previamente reticulada com glutaraldeído, foram adicionados 25,0 mL de solução de epiclоридrina $6,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em solução tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Durante 1 hora, a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, essa solução foi mantida sob agitação e, em seguida, foram adicionados 7,0 mL de solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Após 2 horas em ebulição, a quitosana reticulada com glutaraldeído e epiclоридrina foi lavada com água, solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e, finalmente, com solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, para eliminar o excesso dos reagentes adicionados.

3.3.6.4 Imobilização da peroxidase

A quitosana, em pó, reticulada e ativada pelos três procedimentos descritos, foi utilizada como suporte sólido para a imobilização da peroxidase. Foram adicionadas alíquotas de 35 a 400 μL do extrato enzimático (260 a 3000 U/mL) sobre 0,1 g de quitosana. Após 1 hora sob agitação, esse material foi lavado com tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, para retirar o excesso de enzima, seco e armazenado a temperatura ambiente.

3.3.7 Construção dos biossensores

Foram construídos três biossensores contendo peroxidase de jiló incorporada em matriz de quitosana com grupos amino e hidroxila ativados e reticulados, segundo procedimentos descritos anteriormente.

Inicialmente, foram homogeneizados 375 mg de pó de grafite, 75 % (m/m), e 50 mg de quitosana, 10 % (m/m), contendo em sua matriz 1500 unidades de peroxidase mg⁻¹ de proteína, durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 75 mg de Nujol, 15 % (m/m), homogeneizados por mais 20 min, embutidos em seringas de 1 mL. Finalmente, um fio de cobre (0,4 cm de diâmetro x 11,0 cm de comprimento) foi inserido para obtenção do contato elétrico e usado como eletrodo de trabalho.

3.3.8 Medidas eletroanalíticas e aplicação dos biossensores

As medidas voltamétricas foram realizadas em célula de vidro contendo 10,0 mL de solução fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, em peróxido de hidrogênio 2,0x10⁻³ mol L⁻¹. As medidas de voltametria cíclica foram realizadas em intervalo de potencial de + 0,45 a - 0,45 V vs Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. As medidas de voltametria de onda quadrada foram feitas em uma faixa de potencial de + 0,3 a - 0,6 V, amplitude de potencial de 10 a 200 mV e frequência de 50 a 300 Hz, utilizando solução de hidroquinona.

Os biossensores construídos foram utilizados na determinação de hidroquinona em águas obtidas nos processos de revelação fotográfica e raios-X. Alíquota de 0,10 mL da amostra foi transferida para a célula contendo 10,0 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, peróxido de hidrogênio 2,0x10⁻³ mol L⁻¹ e

o teor de hidroquinona foi determinado pelo método de adição múltipla de padrão. O sinal analítico foi obtido utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada em uma faixa de potencial de + 0,3 a - 0,6 V, amplitude de potencial de 100 mV e frequência de 100 Hz.

Como método oficial para a determinação de hidroquinona nas amostras, foi realizada a titulação redox, utilizando solução de Ce^{4+} 0,05 mol L⁻¹ como titulante¹⁶³.

3.3.9 Biossensor utilizado para determinação de rutina em fármacos

As medidas eletroanalíticas para a otimização e determinação de rutina em fármacos empregando o biossensor (III) foram obtidas seguindo os procedimentos descritos anteriormente. As medidas foram realizadas entre + 0,35 a -0,1 V, a amplitude de potencial foi estudada de 5 a 100 mV e a frequência de 5 a 100 Hz utilizando solução de rutina.

Amostras e produtos farmacêuticos foram preparados e determinados usando o biossensor (III) proposto. Inicialmente foram triturados 10 comprimidos, pesados em triplicata 50 mg, e dissolvidos em solução tampão fosfato 1,0 mol L⁻¹ (pH 7,0) e etanol 10% (v/v). Quando necessário, as amostras foram sonificadas em banho de ultrassom durante 5 minutos e filtradas. Alíquota de 1,0 mL da solução foi transferida para a célula contendo 10,0 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; o teor de rutina foi determinado a partir de adições múltiplas de solução de rutina padrão. Após cada adição, medidas de voltametria de onda quadrada foram efetuadas em uma faixa de potencial de + 0,35 a - 0,1 V, com amplitude de 30 mV e frequência de 25 Hz. Os resultados obtidos com o biossensor proposto foram comparados com os valores rotulados e com o método oficial¹⁶⁴.

3.4. SENSORES BIOMIMÉTICOS

3.4.1 Obtenção dos complexos biomiméticos

O complexo binuclear de Cu^{II} (modelo da polifenol oxidase) e o complexo de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ (modelo fosfatase ácida púrpura), foram sintetizados e caracterizados pelo grupo de bioinorgânica, coordenado pelo Prof. Ademir Neves, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) ¹⁷⁰⁻¹⁷³ e posteriormente usado na construção e aplicação dos sensores biomiméticos descritos nesta tese.

3.4.2 Construção dos sensores biomiméticos

Os sensores biomiméticos usando complexos modelo catecol oxidase e fosfatase foram construídos a partir da homogenização de 50 mg (10% (m/m)) dos respectivos complexos e 375 mg de grafite (75% (m/m)) com homogeneização durante durante 20 min. Para a obtenção da pasta de carbono foram adicionados 75 mg de Nujol, (15% (m/m)), homogeneizado por mais 20 min e embutido em seringa de 1 mL. Em seguida, foi inserido um fio de cobre (0,4 cm de diâmetro x 11,0 cm de comprimento) como contato elétrico e os sensores obtidos usados como eletrodos de trabalho.

3.4.3 Medidas eletroanalíticas e aplicação dos sensores biomiméticos

As medidas voltamétricas usando o sensor biomimético contendo o complexo de Cu^{II} foram realizadas em uma célula de vidro contendo 10 mL de solução fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0. As medidas de voltametria de onda quadrada foram realizadas em um intervalo de potencial de - 0,6 a + 0,2 V e otimizados os parâmetros como

amplitude de potencial (variando 10 a 100 mV) e frequência (10 a 100 Hz), em soluções de hidroquinona padrão. Após a obtenção dos melhores parâmetros, o sensor biomimético foi utilizado na determinação de hidroquinona em cosméticos. Alíquotas de 0,10 mL da amostra foram transferidas para a célula contendo 10,0 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 8,0, os voltamogramas de onda quadrada foram registrados após cada adição de 87,0; 143,0 e 203,0 mg L⁻¹ de hidroquinona padrão. Como método oficial para a determinação de hidroquinona nas amostras, foi empregada a volumetria de óxido-redução¹⁶³.

Os estudos usando o sensor biomimético contendo o complexo de Fe^{II}Fe^{III} foram realizados em condições similares às aquelas empregadas para o sensor biomimético de Cu^{II}. Alterando somente o pH de determinação (pH 7,0) e a faixa das medidas de voltametria de onda quadrada (- 0,4 a + 0,4 V). Após obter as melhores condições operacionais, o sensor foi utilizado na determinação de dopamina em produtos farmacêuticos. Alíquotas de 0,1 mL da amostra foram adicionadas na célula contendo 10 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. Os voltamogramas de onda quadrada foram registrados após cada adição de 0,237; 0,474 e 0,664 mg L⁻¹ de dopamina padrão. Em seguida foi calculado o teor de dopamina na amostra de fármaco e o percentual de recuperação de dopamina padrão. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos usando o método comparativo¹⁶⁵.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 BIOSSENSORES USANDO EXTRATO DE JILÓ COMO FONTE DA ENZIMA PEROXIDASE, IMOBILIZADA EM QUITOSANA PREVIAMENTE RETICULADA POR DIFERENTES PROCEDIMENTOS

4.1.1 Seleção dos vegetais e obtenção da enzima peroxidase

As peroxidases se encontram distribuídas em diversos vegetais e podem ser facilmente extraídas, purificadas e empregadas em trabalhos científicos como também na aplicação industrial^{89,174,175}. Entretanto, a peroxidase isolada da raiz forte tem sido amplamente estudada e comercializada por diversas empresas. Neste trabalho, foram selecionados vários vegetais, a enzima peroxidase obtida e avaliada quanto a atividade, proteína total e atividade específica. Os vegetais selecionados foram a mandioca (*Manihot utilissima*), abacaxi (*Ananas comosus*), goiaba (*Psidium guaiava*), acelga (*Beta vulgaris varietal cyclo*), batata-salsa (*Arracacia xanthorrhiza bancroft*), fruta-do-conde (*Ananas squamosa*), gengibre (*Zingiber officinales Rosc.*) e jiló (*Solanum gilo*). A Tabela 2 mostra os resultados obtidos para cada vegetal selecionado, sendo que a fruta-do-conde, o gengibre e o jiló apresentaram atividade superior aos outros vegetais estudados, com 4.264, 4.923 e 4.960 U mL⁻¹, respectivamente.

Fatibello-Filho e colaboradores empregaram com sucesso extrato de abobrinha (*Cucurbita pepo*) como fonte da enzima peroxidase no desenvolvimento de diversos métodos analíticos^{26,103,110,176}. Recentemente, Fernandes¹⁷⁷ e

colaboradores utilizaram extrato de vagem (*Phaseolus vulgaris*) por apresentar atividade específica de 1.328 unidades mg^{-1} de proteína na construção de biossensores para determinação de ácido cafeico em vinho branco¹⁷⁷. No entanto, atividade de enzimas obtidas de tecidos vegetais depende de vários fatores, entre eles o local do plantio, período do ano, espécie e estado de amadurecimento, sendo geralmente menor em frutas e vegetais não-amadurecidos⁵².

Tabela 2. Atividade, proteína total e atividade específica da peroxidase encontrada no extrato de diversos tecidos vegetais.

Tecido vegetal	Atividade (unidade mL^{-1})	Proteína total (mg mL^{-1})	Atividade específica (unidades mg^{-1} de proteína)
Mandioca	162	0,452	358
Abacaxi	113	0,228	496
Goiaba	105	0,202	520
Acelga	2.235	0,670	3.336
Batata-salsa	2.665	0,162	16.451
Fruta do conde	4.264	0,242	17.619
Gengibre	4.923	0,260	18.935
Jiló	4.960	0,238	20.840

Para o desenvolvimento desse trabalho foi selecionado o vegetal jiló como fonte da peroxidase na construção de biossensores, por apresentar maior atividade específica comparados com os outros vegetais estudados, possuir baixo custo, fácil aquisição e além destas vantagens este vegetal é cultivado durante o ano inteiro e

não existe nenhum relato na literatura quanto à identificação e quantificação de peroxidase neste vegetal.

4.1.2 Efeito do pH sobre extração da peroxidase

As enzimas são fortemente influenciadas pelo pH do meio, geralmente possuem pH ótimo na qual a atividade e a velocidade das reações é máxima. Sendo assim, investigou-se o efeito do pH (4 a 9) na extração da peroxidase do extrato de jiló, medindo-se a variação da absorbância do tetraguaicol formado da reação entre a peroxidase, guaiacol e peróxido de hidrogênio. Posteriormente, foi calculada a atividade específica da peroxidase, e a melhor resposta foi obtida em pH 7,0, decrescendo em pH inferiores e superiores como mostra a Figura 11. Conseqüentemente, os estudos posteriores de extração da peroxidase foram realizados em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

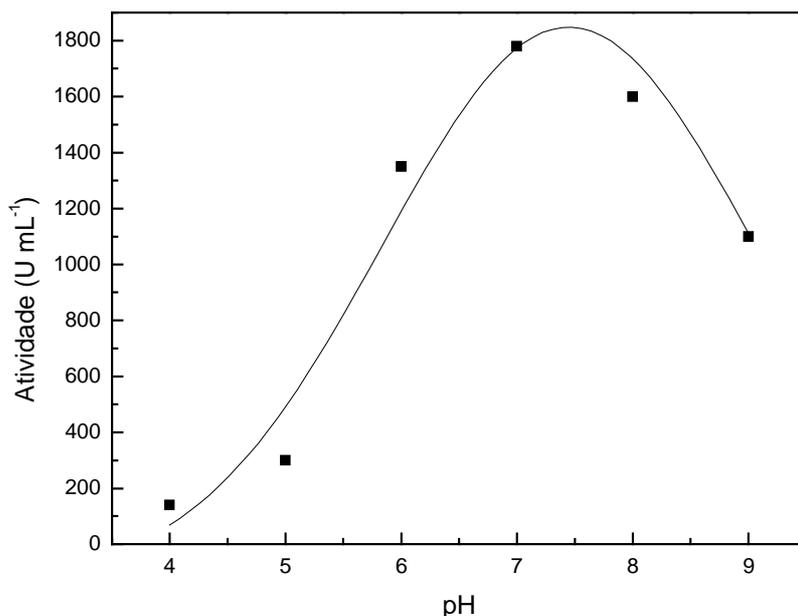


Figura 11. Efeito do pH (4 a 9) sobre a extração da peroxidase de jiló.

4.1.3 Tempo de armazenamento e estabilidade da peroxidase

Os compostos fenólicos naturais presentes na maioria dos vegetais são responsáveis pelo escurecimento do tecido vegetal, este processo aliado a oxidação promovida pelo oxigênio do ar podem causar uma diminuição da atividade enzimática de extratos vegetais no decorrer do tempo. Vieira¹⁶⁵, com o objetivo de minimizar estes efeitos, estudou diversas substâncias protetoras (Polyclar K-30, L-cisteína, Polyclar AT, Polyclar R, Polyclar SB-100, entre outros) na extração da polifenol oxidase de batata doce (*Ipomoea batatas (L.) Lam.*). Estes agentes protetores atuam na remoção dos compostos fenólicos naturais conservando e/ou aumentando a atividade enzimática. Vieira¹⁶⁵ obteve melhores resultados empregando o agente Polyclar SB-100, que manteve a atividade da polifenol oxidase por 152 dias à 4 °C.

Neste trabalho, foi investigado o tempo de armazenamento e a estabilidade da peroxidase de jiló durante 53 dias. Utilizaram-se três procedimentos para a extração da enzima: água a 4°C, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e Polyclar SB-100. A atividade foi medida periodicamente e os valores da atividade (U mL⁻¹) da peroxidase estão mostrados na Figura 12.

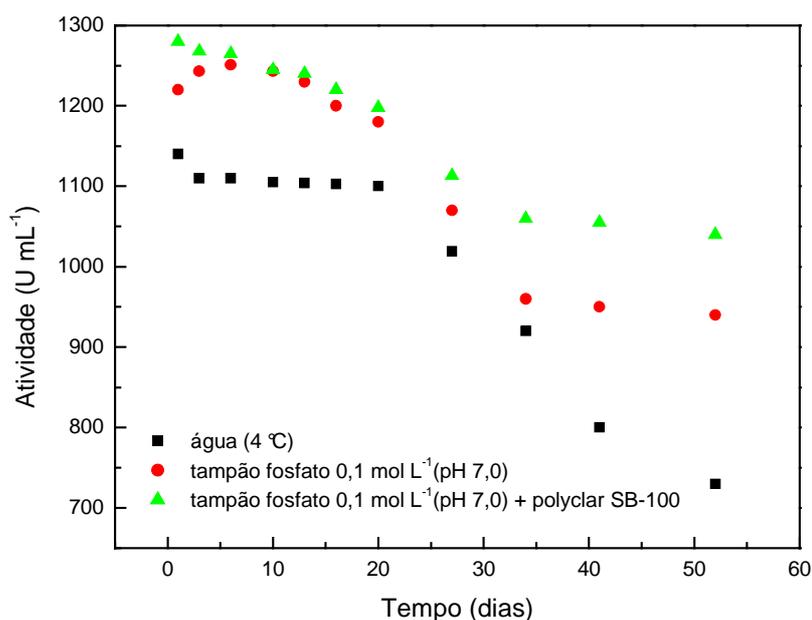


Figura 12. Estudo do tempo de armazenamento (4°C) da atividade da peroxidase de jiló, extraído em água, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) + Polyclar SB-100.

No período de 25 dias de estocagem do extrato de jiló, não foram observadas mudanças significativas na atividade da enzima usando os processos de extração em tampão fosfato e tampão fosfato + Polyclar. A peroxidase extraída em água apresentou menor atividade, no entanto, observou-se menor variação da atividade comparada aos outros procedimentos. Após este período, a peroxidase extraída empregando o agente protetor manteve maior atividade específica. Pode ser observada uma menor atividade específica para a peroxidase extraída somente em água, comprovando a necessidade do tampão fosfato para manter a estabilidade da enzima durante um tempo maior. Por não observar uma diferença significativa na atividade da enzima nos processos de extração empregando somente tampão,

tampão + Polyclar e para facilitar o processo, optou-se neste trabalho utilizar apenas tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) para extração da peroxidase de jiló.

4.1.4 Grau de desacetilação (% GD) da quitosana

A partir do GD determina-se o percentual de grupos amino na quitosana, um $\text{GD} \geq 50 \%$ define o material polimérico como quitosana, essa característica é uma das principais propriedades que diferencia a quitosana da quitina^{53,56,179,180}.

Existem vários métodos para a determinação do % GD da quitosana^{179,180}, o ideal é que esses métodos sejam simples, eficientes e rápidos. Considerando essas características, a condutimetria foi utilizada para a quantificação do GD da quitosana. Nesta titulação, ocorre a protonação dos grupos amino da quitosana devido ao excesso de ácido clorídrico. A Figura 13 mostra o gráfico obtido para a quitosana, a curva apresenta dois pontos de inflexão, ou seja, dois pontos de equivalência, sendo o primeiro correspondente a neutralização do ácido clorídrico que se encontrava em excesso e o segundo referente à neutralização da forma ácida do polímero. A diferença entre o volume dos dois pontos de equivalência ($V_2 - V_1$) corresponde ao volume de base requerido para neutralizar os grupos amino protonados da quitosana. O GD foi calculado pela equação 2 (item 3.3.5), obtendo-se uma porcentagem de grupos amino livres de 82 %, considera-se portanto, 18 % de grupos acetamida. O GD pode variar de acordo com a procedência da quitosana, no entanto, os resultados obtidos pela técnica de titulação condutométrica empregada neste trabalho estão próximos dos valores encontrados na literatura^{53,56,179,180}.

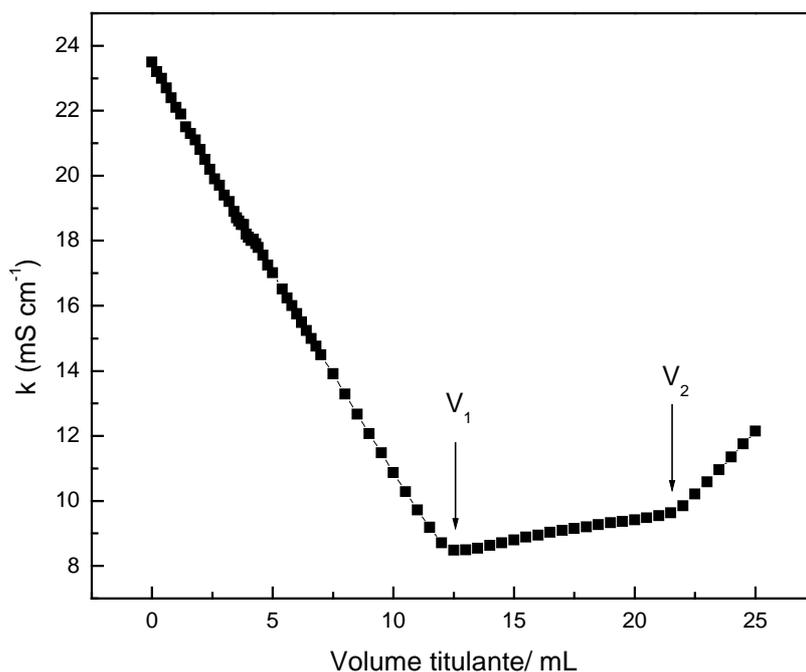


Figura 13. Curva de titulação condutométrica da quitosana, titulante (NaOH 0,1 mol L⁻¹).

4.1.5 Estudo do tempo de reticulação da quitosana com glutaraldeído

Na literatura encontram-se divergências em relação ao tempo necessário para a reticulação da quitosana com glutaraldeído, alguns trabalhos relatam a necessidade de 24 h, enquanto outros trabalhos 2 h^{74,81,181,182}. Devido a estas divergências e com a finalidade de acelerar o processo e comprovar o tempo necessário para a completa reticulação dos grupos amino da quitosana com glutaraldeído, foi investigado um período de 10 min a 24 h de reação. Após este tempo, realizou-se a titulação condutimétrica para cada amostra a fim de avaliar o percentual de grupos amino livres da quitosana. O máximo de reticulação, 100 %, foi

obtido em solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v) a partir de 10 min de reação. A figura 14 mostra a curva de titulação condutométrica da quitosana reticulada em 10 min de reação. Como pode ser observado ocorre somente um ponto de inflexão, não verificando a neutralização da forma ácida do polímero, logo se considera que todos os grupamentos amino da quitosana estejam reticulados com glutaraldeído. As demais amostras com tempo diferente de reticulação apresentaram o mesmo perfil da Figura 14. No entanto, para evitar eventuais erros e garantir a total reticulação da quitosana, selecionou-se o tempo de reticulação de 30 min, para o desenvolvimento deste trabalho.

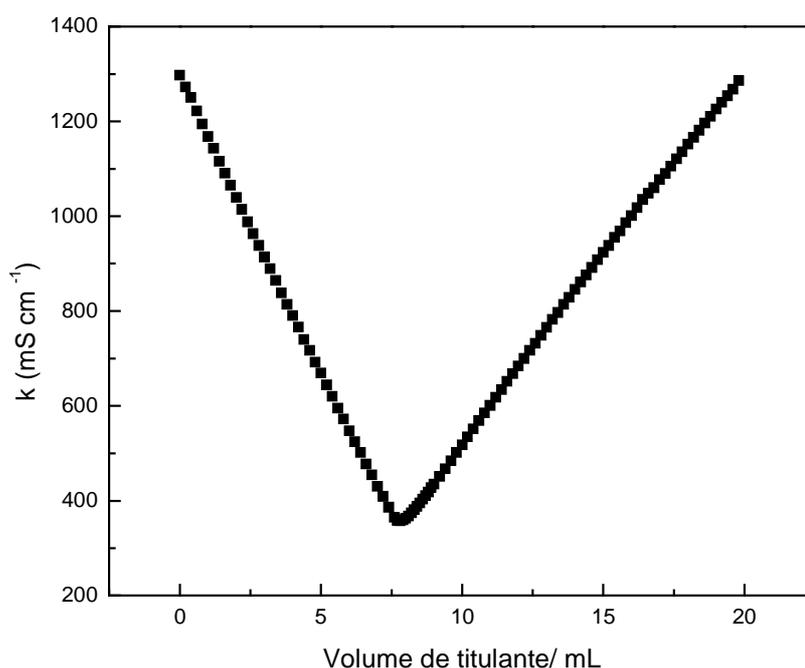


Figura 14. Curva de titulação condutométrica da quitosana reticulada (30 min de reação), titulada com NaOH 0,1 mol L⁻¹.

4.1.6 Imobilização da peroxidase na matriz da quitosana reticulada com glutaraldeído

As propriedades e a eficiência das enzimas imobilizadas são dependentes da enzima e principalmente do suporte empregado no processo de imobilização. A quitosana é conhecida como um suporte ideal para a imobilização de enzimas devido a diversas características que apresenta e, além disso, possui grupos funcionais que são susceptíveis a modificações químicas facilitando a imobilização de enzimas^{53,56,57}.

Apesar da reação do glutaraldeído com a quitosana ser muito utilizada, o mecanismo da reação e a estrutura do composto formado não estão completamente elucidados. Normalmente, para a reticulação da quitosana com glutaraldeído três propostas de reações são sugeridas¹⁸²⁻¹⁸⁴.

- (A) Formação de somente uma base de Schiff, entre um grupo aldeído do glutaraldeído e um grupo amino da quitosana. O outro grupo aldeídico permanece livre e pode ser usado para uma reação subsequente¹⁸².
- (B) Reticulação entre uma molécula de glutaraldeído e duas unidades monoméricas da quitosana, envolvendo ambos os grupos aldeídicos da molécula de glutaraldeído, resultando na formação de duas bases de Schiff¹⁸³.
- (C) Reação de polimerização do glutaraldeído com a quitosana, formando uma rede polimérica¹⁸⁴.

Baseado nestas informações¹⁸²⁻¹⁸⁴, a Figura 15 ilustra a sugestão para a reação entre a quitosana, glutaraldeído e a peroxidase. A enzima pode estar ligada ao grupo aldeídico que não reagiu com os grupos amino da quitosana e também

encontrar-se aprisionada na rede polimérica formada pelo agente de reticulação e a quitosana.

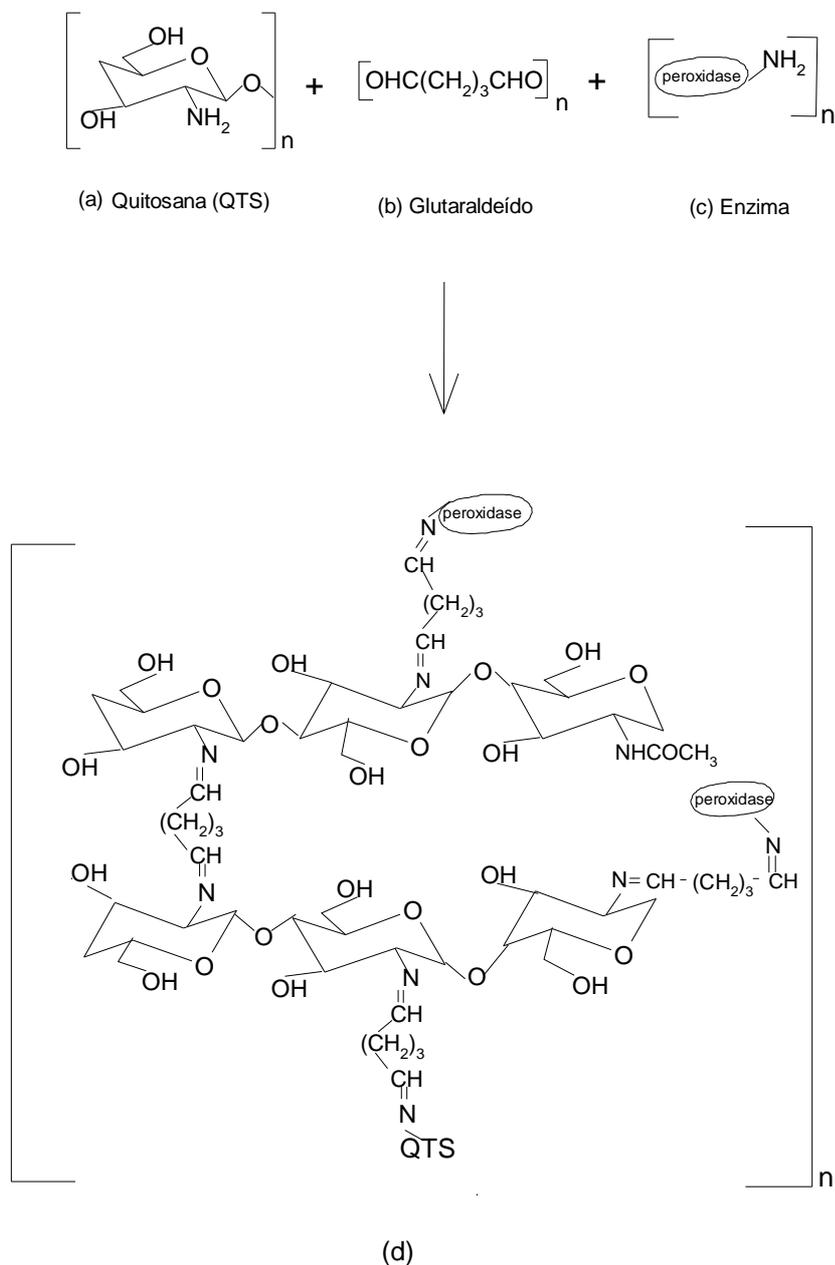


Figura 15. Esquema da reação entre a (a) quitosana (QTS), (b) glutaraldeído, (c) enzima peroxidase e (d) produto final da reação, (procedimento I).

4.1.7 Imobilização da peroxidase na matriz da quitosana reticulada com glutaraldeído e carbodiimida

A imobilização de proteínas em materiais poliméricos como a quitosana, comumente emprega-se o glutaraldeído como agente reticulante, que estabelece ligações intermoleculares entre os grupos amino da quitosana e também com os grupos amino da enzima. Para promover maior eficiência na imobilização de proteínas na matriz da quitosana podem ser empregados agentes que ativem os grupos hidroxila deste polímero.

A carbodiimida (EDC) geralmente é utilizada para ativar suportes carboxilados e a imobilização da enzima é obtida a partir de ligações dos grupos carboxil do suporte e os grupos amino da enzima, obtendo-se o produto final mostrado no esquema da Figura 16¹⁸⁵.

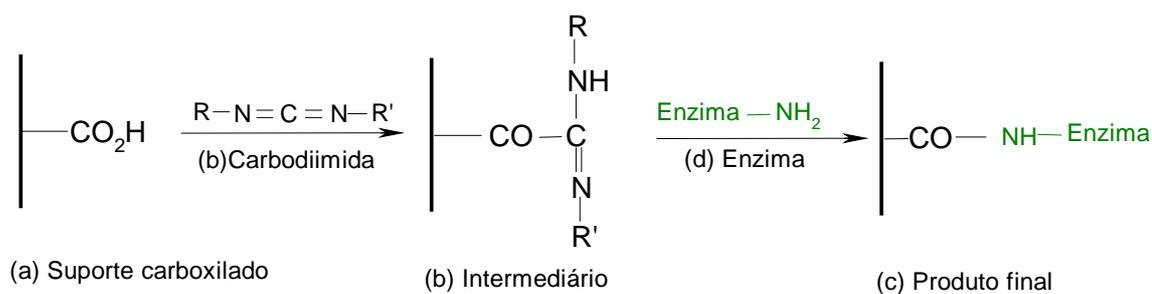


Figura 16. Esquema da reação entre um (a) suporte carboxilado, (b) carbodiimida e (c) enzima¹⁸⁵.

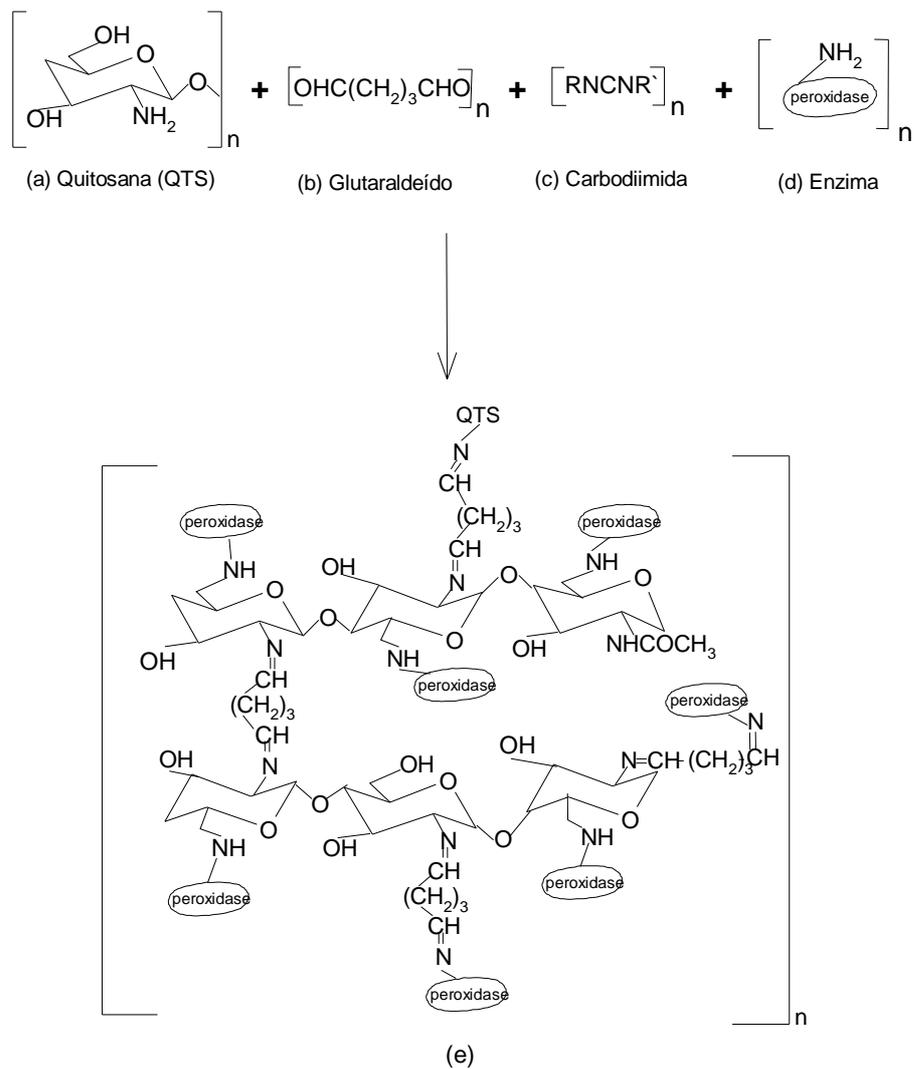


Figura 18. Esquema da reação entre a (a) quitosana, (b) glutaraldeído, (c) carbodiimida e (e) enzima peroxidase, (procedimento II).

4.1.8 Imobilização da peroxidase na matriz da quitosana reticulada com glutaraldeído e epiclорidrina

A maioria dos biossensores apresenta uma resposta ao analito que diminui gradualmente ao longo dos dias. Perdas pequenas com o passar dos dias ou meses são observadas, havendo necessidade de re-calibração do biossensor empregando solução de referência do analito e/ou construção de um novo biossensor. Portanto, estratégias de imobilização de enzimas na construção de biossensores se tornam interessantes para a obtenção de eletrodos enzimáticos mais sensíveis, estáveis, com maior tempo de uso.

O biossensor (III) foi construído com o objetivo de comparar a eficiência da imobilização da enzima utilizando um terceiro agente reticulante. A epiclорidrina pode ser usada para a insolubilização da quitosana através da formação de uma rede polimérica. A reação da epiclорidrina com a quitosana envolve a abertura do anel epóxido, com a posterior reação com os grupos hidroxila sob condições alcalinas, mantendo os grupos amino livres⁸³. A Figura 19 ilustra a reação entre a quitosana e epiclорidrina para a obtenção da quitosana reticulada.

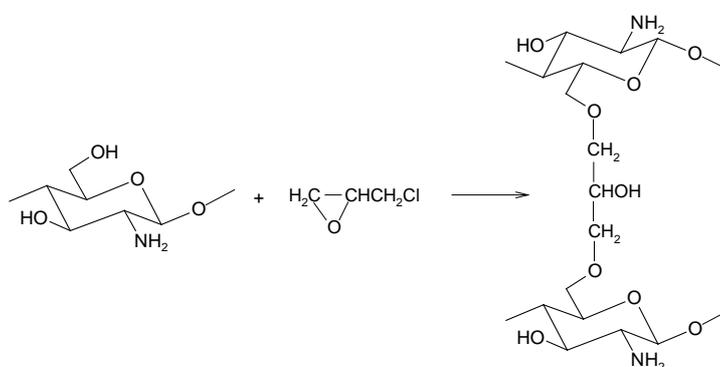


Figura 19. Reação de reticulação da quitosana com epiclорidrina.

A Figura 20 mostra uma sugestão da reação entre a quitosana com o glutaraldeído, epiclorigrina e a peroxidase, reação utilizada neste trabalho. A estrutura final (e) sugere a imobilização da peroxidase ligada ao grupo aldeídico do glutaraldeído e também ocluída “entrapada” nos espaços intersticiais promovidos pelos agentes reticulantes.

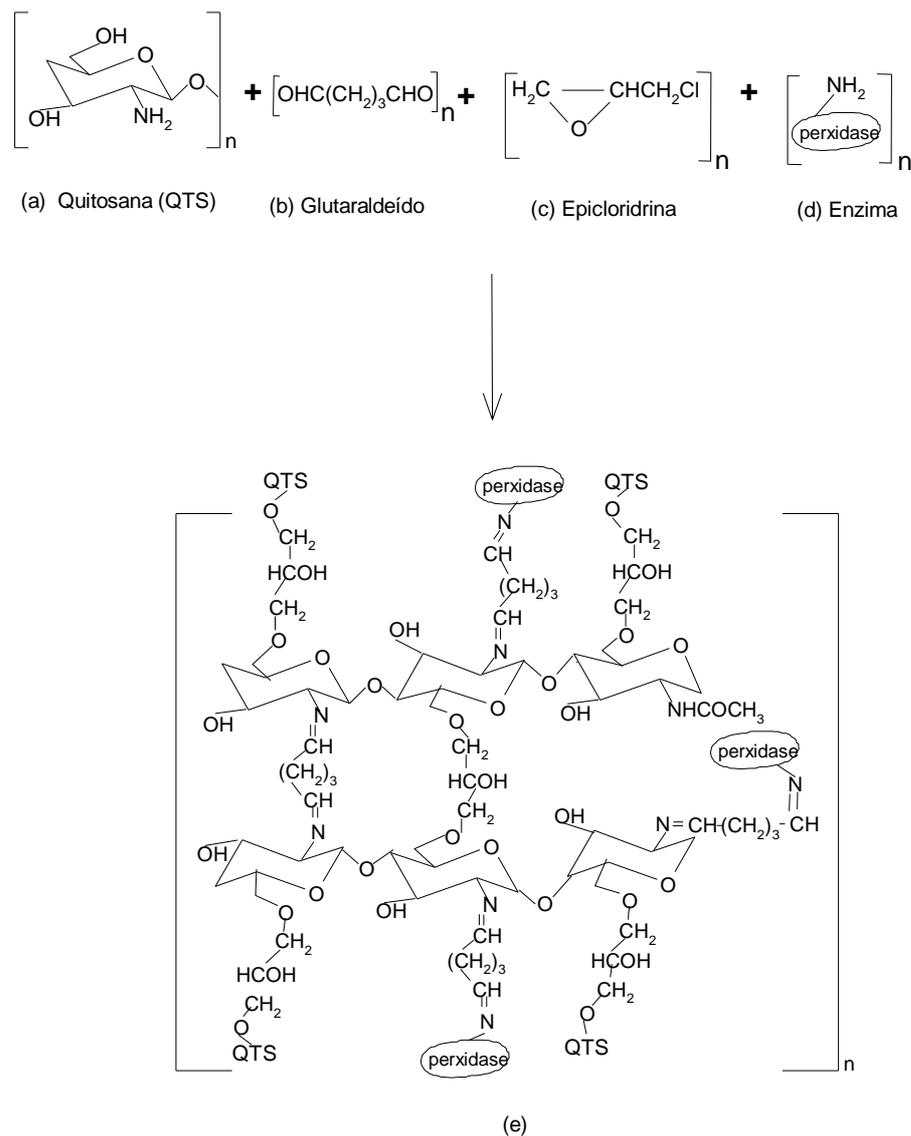


Figura 20. Esquema da reação entre a (a) quitosana, (b) glutaraldeído, (c) epiclorigrina e (d) enzima peroxidase (procedimento III).

4.1.9 Otimização dos biossensores

Os biossensores de pasta de carbono modificados com a enzima peroxidase incorporada na matriz da quitosana, previamente reticulada e ativada, foram otimizados, estudando o efeito da concentração da enzima, composição dos biossensores (grafite/Nujol), pH, frequência e amplitude de potencial.

4.1.9.1 Estudo de grafite/Nujol

A composição de grafite/Nujol na construção dos biossensores foi averiguada a partir proporção de 65/25; 70/20; 75/15; 80/10 % (m/m) de grafite/Nujol e mantendo constante o percentual de 10 % de quitosana (contendo 3,2 U de peroxidase/mg de pasta de carbono). Após a construção, a resposta dos biossensores foi estudada medindo-se a corrente de pico catódica por voltametria de onda quadrada em solução de hidroquinona $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Os resultados obtidos para os biossensores (I, II e III) estão ilustrados na Figura 21. Como pode ser observado, a melhor resposta foi obtida na composição de 75/15/10 % (m/m) de grafite/Nujol/enzima imobilizada em quitosana reticulada para ambos os sensores. Estes resultados concordam com dados obtidos anteriormente^{46,47}, onde a melhor resposta do biossensor foi obtida na composição de 75/15/10 % (m/m) de grafite/Nujol/enzima. Portanto, essa composição de pasta de carbono foi selecionada para a construção e aplicação dos biossensores.

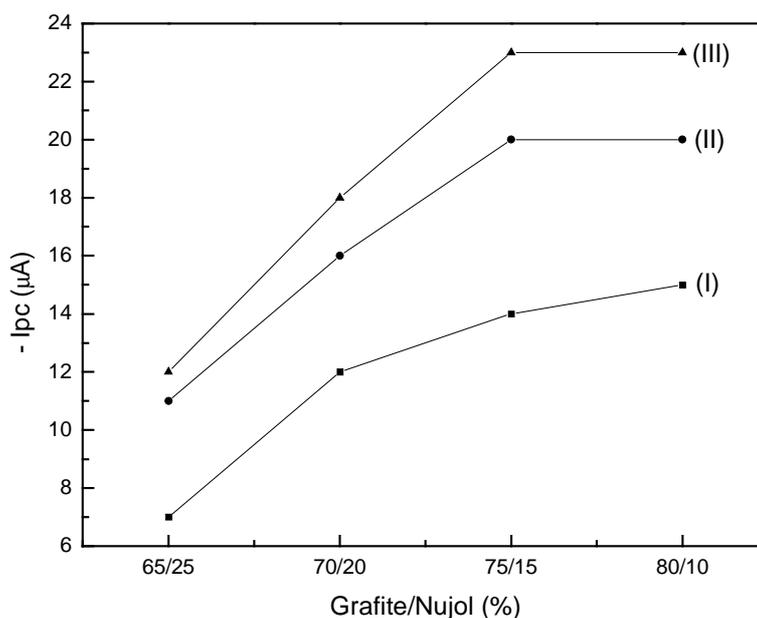


Figura 21. Estudo da proporção de grafite/nujol na construção dos biossensores (I, II, III) em solução de hidroquinona 5×10^{-4} mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, amplitude de potencial 100 mV e frequência de 100 Hz.

4.1.9.2 Estudo da concentração da peroxidase de extrato de jiló

O efeito da concentração da enzima sobre a resposta dos biossensores foi estudado na faixa de 0,69 a 8,0 U/ mg de pasta de carbono. Os sinais analíticos (I_{pc}) obtidos em solução de hidroquinona $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para os biossensores propostos, estão mostrados na Figura 22.

Há um aumento da resposta dos biossensores até a concentração de 4,0 U/mg pasta de carbono, mantendo-se constante em concentrações superiores. Escolheu-se, então, a concentração 4,0 U/ mg de pasta de carbono para construção dos biossensores.

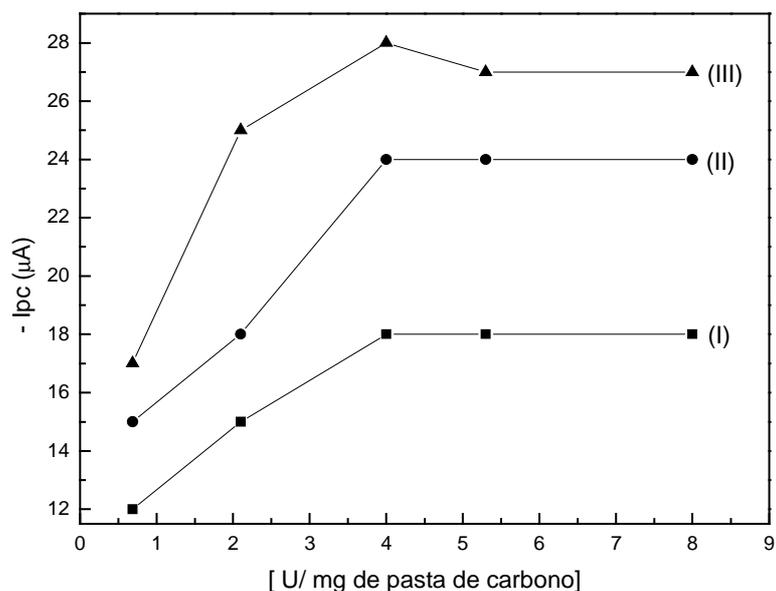


Figura 22. Efeito da concentração de peroxidase (0,69 a 8,0 U/ mg de pasta de carbono) em hidroquinona $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, 100 mV e 100 Hz.

4.1.9.3 Efeito do pH

O pH tem grande influência sobre as reações enzimáticas. Foi estudado, então, o efeito do pH (5,0 a 9,0) sobre a resposta dos biossensores, Figura 23, em solução de hidroquinona $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. A maior resposta analítica dos biossensores foi verificada em pH 7,0, conseqüentemente, os estudos posteriores foram realizados em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0.

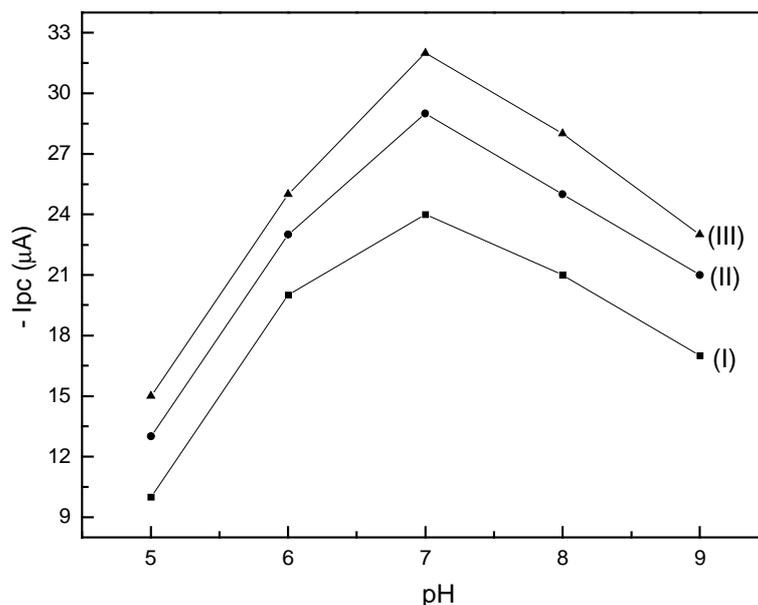


Figura 23. O efeito do pH (5,0 a 9,0) sobre a resposta analítica dos biossensores em solução de hidroquinona $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, 100 mV e 100 Hz.

4.1.9.4 Estudo dos parâmetros da voltametria de onda quadrada

O parâmetro equivalente à velocidade de varredura da voltametria de onda quadrada é a frequência de aplicação dos pulsos, (f). A otimização desse parâmetro é de fundamental importância, pois para a maioria dos processos eletrodicos, a corrente de pico é diretamente proporcional ao seu valor. Assim, com a maximização do valor de f , aumenta-se, conseqüentemente, a sensibilidade da técnica¹¹². O efeito de f foi estudado em intervalo de 50 a 200 Hz, sobre a resposta do biossensor em solução de hidroquinona $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, peróxido de hidrogênio

$2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, e amplitude de potencial de 100 mV e os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 24.

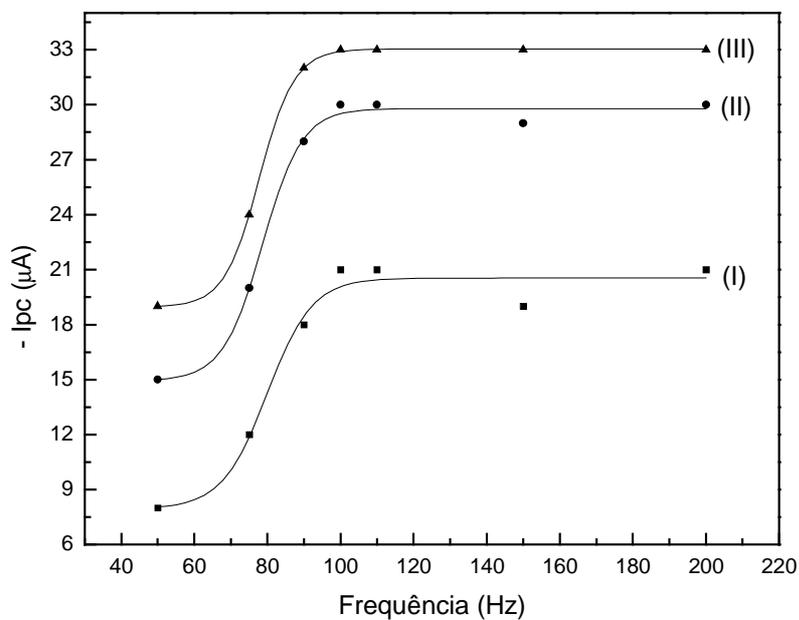


Figura 24. Estudo do efeito da frequência (50 a 200 Hz) sobre a resposta analítica dos biossensores I, II e III. Análises realizadas em solução de hidroquinona $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e amplitude de 100 mV.

Como pode ser observado, há um aumento da resposta do biossensor até 100 Hz, mantendo-se constante em frequências superiores. Essa frequência foi então selecionada para os estudos posteriores. Outro parâmetro importante a ser otimizado nessa técnica é a amplitude do pulso de potencial aplicado, a . O efeito da variação desse parâmetro foi estudado em uma faixa de 10 a 200 mV, Figura 25. O maior sinal analítico foi obtido em 100 mV usando solução de hidroquinona $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e frequência 100 Hz. Sendo assim, essa amplitude foi selecionada para o desenvolvimento deste trabalho.

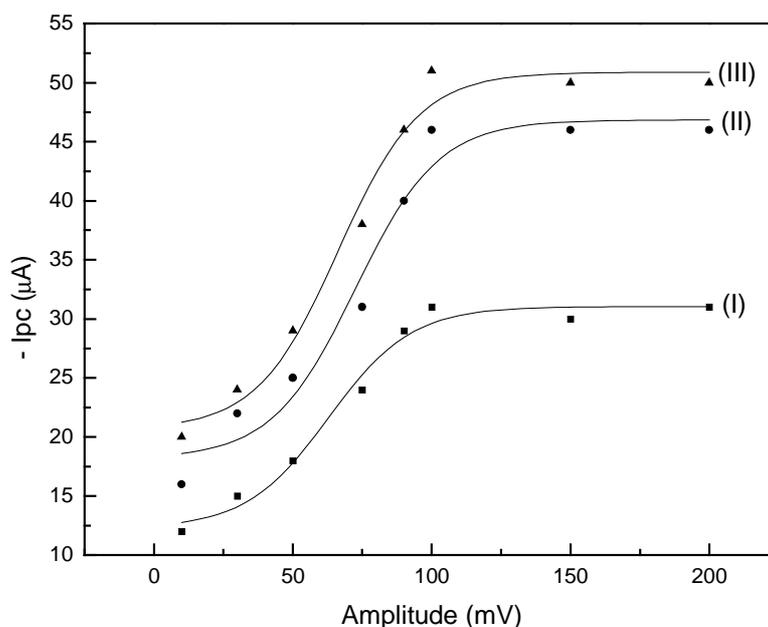


Figura 25. Estudo do efeito da amplitude do potencial (10 a 200 mV) em solução de hidroquinona $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e frequência de 100 Hz.

4.1.10 Voltametria cíclica

A redução eletroquímica da p-quinona formada na reação enzimática na superfície do biossensor foi investigada usando voltametria cíclica. A peroxidase catalisa a oxidação da hidroquinona a p-quinona na presença do peróxido de hidrogênio e posteriormente a p-quinona é reduzida eletroquimicamente na superfície do biossensor em potencial de - 0,20 V, conforme é ilustrado no esquema da Figura 26.

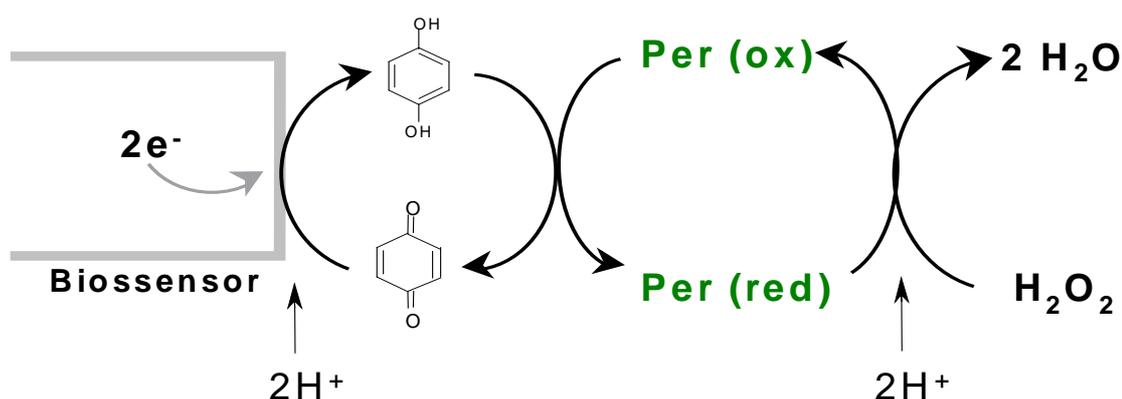


Figura 26. Esquema do processo enzimático entre a hidroquinona, peróxido de hidrogênio, peroxidase e redução eletroquímica da quinona na superfície do biossensor. Per (ox)= peroxidase estado oxidado, Per (red)=peroxidase no estado reduzido.

A Figura 27 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos com os biossensores contendo extrato de jiló como fonte da enzima peroxidase, imobilizada na matriz de

quitosana, usando os três procedimentos: (I) grupos amino reticulados com glutaraldeído; (II) grupos amino reticulados com glutaraldeído e grupos hidroxila ativados com carbodiimida; (III) grupos amino reticulados com glutaraldeído e grupos hidroxila reticulados com epicloridrina em solução de hidroquinona $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. Neste trabalho, as medidas de voltametria cíclica foram realizadas em uma faixa de potencial de + 0,45 a - 0,45 V vs eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) para uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

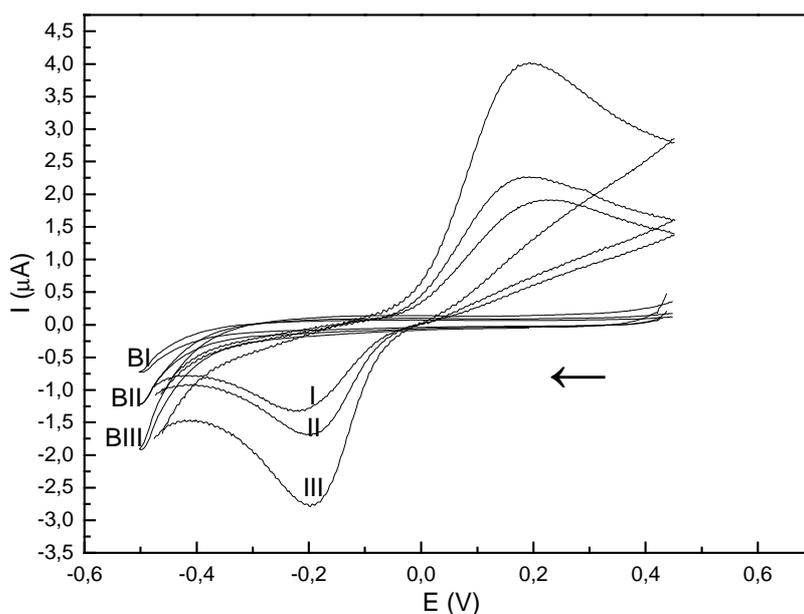


Figura 27. Voltamogramas cíclicos obtidos usando os biosensores propostos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e velocidade de varredura 100 mV s⁻¹. Voltamogramas (BI, BII e BIII) obtidos em H₂O₂ $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e (I, II e III) em solução de hidroquinona $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e H₂O₂ $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

No biossensor (I) a enzima peroxidase foi imobilizada na quitosana reticulada com glutaraldeído, sendo que o menor sinal de corrente de pico catódico, I_{pc} foi observado nesse eletrodo. O melhor procedimento para a imobilização da peroxidase foi obtido usando a quitosana reticulada com glutaraldeído e epicloridrina, como mostra a Figura 27, voltamograma (III), que apresentou maior corrente de pico catódico. O melhor desempenho do biossensor (III) pode ser devido à formação mais efetiva da rede tridimensional polimérica, tornando o suporte com maior porosidade, onde a enzima pode estar confinada (aprisionada, ocluída) entre os espaços das ligações covalentes formadas, e/ou ligada a um dos grupos aldeídos do glutaraldeído. Sendo assim, o melhor desempenho dos biossensores propostos neste trabalho está na ordem: biossensor (III) > biossensor (II) > biossensor (I).

4.1.11 Voltametria de onda quadrada

Neste trabalho, as medidas de voltametria de onda quadrada, usando os eletrodos de pasta de carbono modificados com a enzima peroxidase foram investigadas no intervalo de potencial de + 0,3 a – 0,6 V com amplitude de 100 mV, frequência de 100 Hz e pH 7,0. A Figura 28 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos na redução eletroquímica da p-quinona na superfície dos biossensores (I), (II) e (III). A curva analítica para o biossensor (I) ($I_{pc}=1,445 + 1,538 \times 10^4$ [hidroquinona]; $r=0,9998$, biossensor (II) ($I_{pc}=4,219 + 2,903 \times 10^4$ [hidroquinona]; $r=0,9998$ e biossensor (III) ($I_{pc}=1,937 + 3,504 \times 10^4$ [hidroquinona]; $r=0,9994$, foram construídas a partir das correntes de pico catódicas (I_{pc}), medidas em potencial de aproximadamente – 0,18 V em função da concentração de hidroquinona.

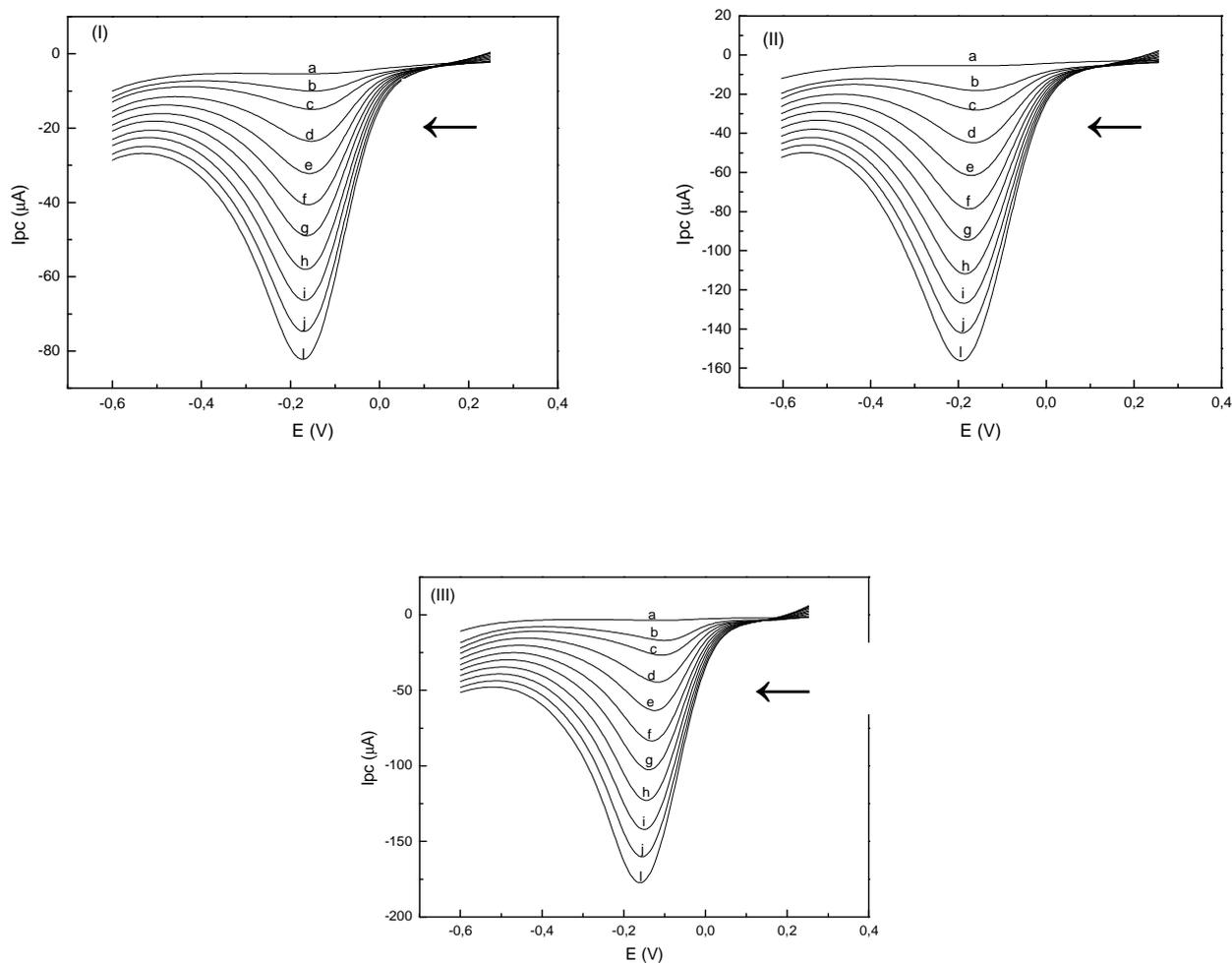


Figura 28. Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando os biossensores (I), (II) e (III). (a) solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e soluções de hidroquinona nas concentrações (b) $2,5 \times 10^{-4}$; (c) $5,0 \times 10^{-4}$; (d) $1,0 \times 10^{-3}$; (e) $1,5 \times 10^{-3}$; (f) $2,0 \times 10^{-3}$; (g) $2,5 \times 10^{-3}$; (h) $3,0 \times 10^{-3}$; (i) $3,5 \times 10^{-3}$; (j) $4,0 \times 10^{-3}$; (l) $4,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; amplitude de 100 mV s^{-1} e frequência de 100 Hz .

A Figura 29 mostra a relação linear entre as correntes de pico catódicas e as concentrações de hidroquinona no intervalo de $2,5 \times 10^{-4}$ a $4,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Foi observado uma maior sensibilidade (inclinação da curva analítica) para o biossensor (III) contendo os grupos amino reticulados com glutaraldeído e grupos hidroxila reticulados com epícloridrina.

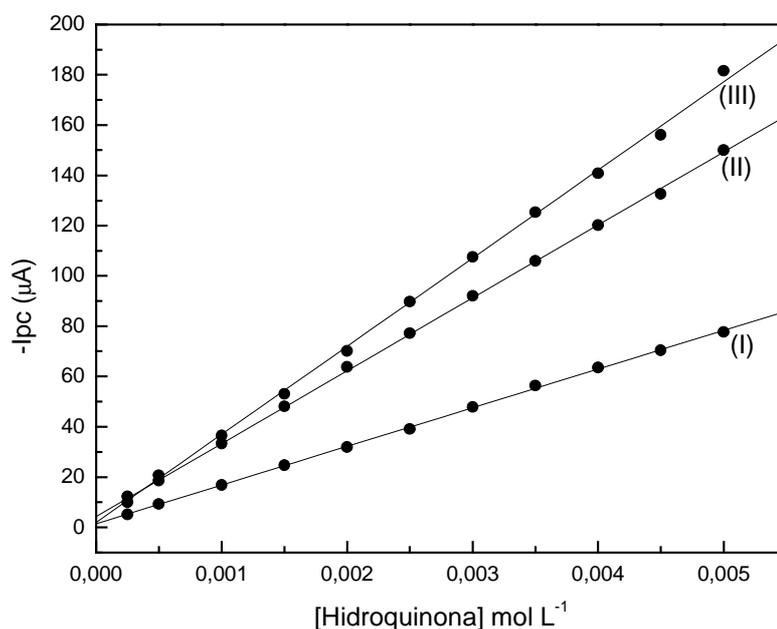


Figura 29. Curvas analíticas para hidroquinona obtidas com os biossensores propostos usando voltametria de onda quadrada.

4.1.12 Repetibilidade, reprodutibilidade dos biossensores

O estudo da repetibilidade foi feito utilizando os biossensores propostos e quinze sucessivas medidas foram obtidas para cada eletrodo em solução de hidroquinona $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, em tampão

fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. O desvio padrão relativo encontrado foi menor que 1,0 % para os biossensores construídos.

O estudo de reprodutibilidade foi realizado, empregando cinco biossensores construídos para os três tipos de procedimentos de imobilização da peroxidase, e nas mesmas condições experimentais. As medidas foram obtidas em triplicata para os biossensores construídos em solução de hidroquinona $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. O desvio padrão relativo encontrado para os biossensores (I), (II) e (III) foi de 3,0; 3,3 e 3,2 % respectivamente.

4.1.13 Estudo de recuperação e determinação de hidroquinona

Os resultados obtidos no estudo de recuperação de hidroquinona em amostras de águas obtidas nos processos de revelação fotográfica e raios-X, utilizando voltametria de onda quadrada e os biossensores propostos, estão listados na Tabela 3. Neste estudo foram adicionadas em cada amostra 83,3, 162 e 195 mg L^{-1} de solução de hidroquinona padrão, seguido da determinação deste composto e cálculo da porcentagem de recuperação. Os valores de recuperação de hidroquinona variaram de 95,1 – 105 % para o biossensor (I), 97,8 – 101 % para biossensor (II) e 98,8 – 103 % para o biossensor (III). Os resultados obtidos indicam que os procedimentos analíticos propostos não sofrem interferências das matrizes dessas amostras.

Tabela 3. Estudo de adição e recuperação de hidroquinona em água de processo de revelação fotográfica e de raios-X.

Amostra	Adicionado	Hidroquinona (mg mL ⁻¹)					
		Biossensores*			Recuperado (%)		
		(I)	(II)	(III)	(I)	(II)	(III)
A	83,3	83,0±0,1	83,2±0,1	83,1±0,1	99,6	99,9	99,8
	162	159,0±0,2	164,0±0,2	160,0±0,1	98,1	101	98,8
	195	192,0±0,2	190,0±0,2	197,0±0,1	98,5	97,4	101
B	83,3	84,0±0,1	86,4±0,1	87,2±0,1	95,1	97,8	98,7
	162	170,0±0,1	165,0±0,1	160,0±0,2	105	102	99,4
	195	190,0±0,1	193,0±0,2	201,0±0,2	97,4	99,0	103

*n=6, nível de confiança 95%

A= água de processo de revelação fotográfica, B= água de processo de raios-X.

Para avaliar o desempenho dos biossensores, determinou-se a concentração de hidroquinona em água obtida do processo de revelação fotográfica e de raios-X utilizando voltametria de onda quadrada. A Tabela 4 apresenta uma comparação entre a determinação de hidroquinona obtida pelos biossensores propostos e o método oficial¹⁶³. Os teores de hidroquinona encontrados utilizando os procedimentos propostos estão em concordância com a metodologia oficial, a um nível de confiança de 95% e dentro do intervalo de erro aceitável.

Tabela 4. Determinação de hidroquinona em água de processo de revelação fotográfica e de raios-X.

Amostra	Hidroquinona (mg L ⁻¹)						
	Método	Biossensores*			Erro Relativo (%)		
	oficial	(I)	(II)	(III)	(I)	(II)	(III)
A	28,90 ±0,02	28,80 ±0,03	27,80±0,07	29,10 ±0,02	-0,4	-3,8	+0,69
B	28,60 ±0,01	27,90 ±0,05	27,20±0,03	28,30±0,01	-2,4	-4,9	-1,0
C	33,00 ±0,03	32,60 ±0,08	31,40±0,03	32,90 ±0,03	-1,2	-4,8	-0,30
D	32,90 ±0,05	30,90 ±0,03	33,00±0,08	31,70 ±0,05	-6,1	+0,30	-3,6

*n=6, nível de confiança 95%

A, B=água de processo de revelação fotográfica,
C, D=água de processo de raios-X.

4.2 DETERMINAÇÃO DE RUTINA EM FÁRMACOS

Nos estudos mostrados anteriormente, o biossensor (III), construído a partir da imobilização da peroxidase de jiló em quitosana reticulada e ativada com glutaraldeído e epícloridrina, respectivamente, apresentou maior sensibilidade, comparado com os demais biossensores desenvolvidos. Assim, foi selecionado para determinação do flavonóide rutina e comparado com os dados obtidos para hidroquinona.

4.2.1 Voltametria cíclica

O processo de redução e oxidação da rutina no meio reacional foi investigado usando a técnica de voltametria cíclica. A Figura 30 mostra as medidas realizadas em uma faixa de potencial de + 0,45 a – 0,15 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 mol L⁻¹ (pH 7,0) contendo: (a) peróxido de hidrogênio 2,0x10⁻³ mol L⁻¹, (b) rutina 3,0x10⁻³ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio 2,0x10⁻³ mol L⁻¹ usando o biossensor proposto como eletrodo de trabalho. Na ausência de rutina, voltamograma (a), não foi observado nenhum sinal de pico catódico ou anódico. No entanto, o voltamograma (b) apresenta um pico anódico referente a oxidação da rutina na correspondente *o*-quinona em potencial de + 0,145 V, reação esta catalizada pela peroxidase em presença do peróxido de hidrogênio. Um pico de corrente catódica foi observado em + 0,124 V, referente a redução eletroquímica da *o*-quinona com transferência de dois elétrons, como exemplifica o esquema da Figura 31.

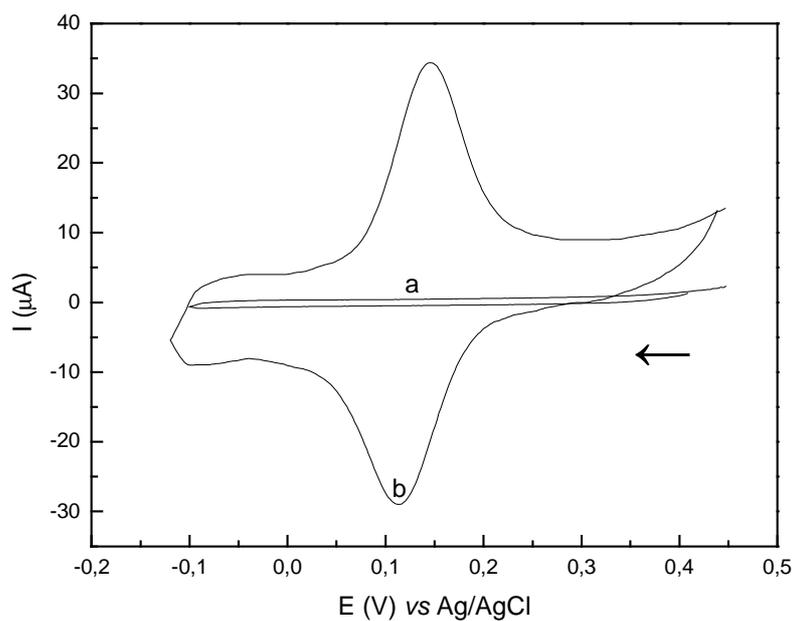


Figura 30. Voltamogramas cíclicos obtidos usando o biossensor proposto em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo (a) H_2O_2 $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina e $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$.

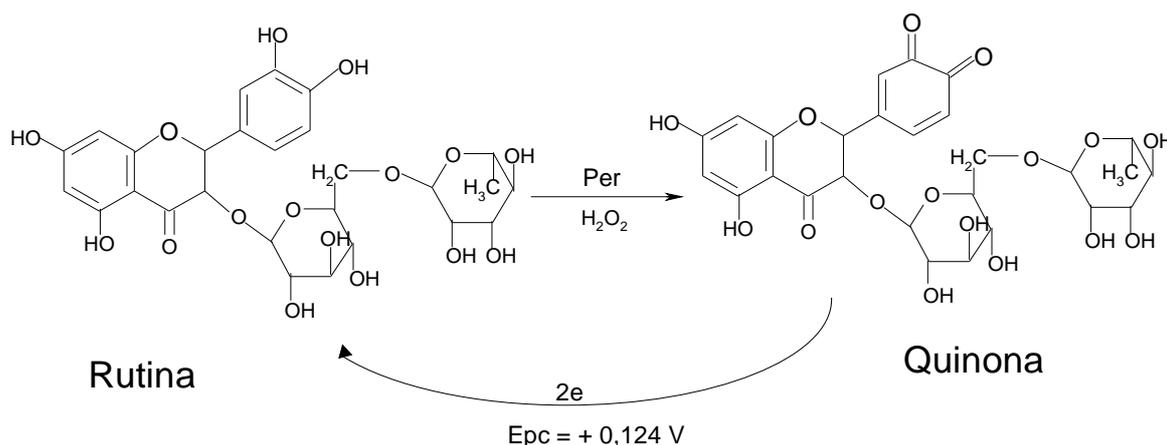


Figura 31. Representação esquemática do processo enzimático entre a rutina, peróxido de hidrogênio e a peroxidase.

4.2.2 Otimização do biossensor

Para avaliar o desempenho do biossensor proposto, empregado na determinação de rutina, alguns parâmetros experimentais foram investigados usando a voltametria de onda quadrada, entre eles, o pH, frequência e amplitude de potencial.

O efeito do pH sobre a resposta do biossensor foi investigado entre pH 5,0 a 9,0 em solução de rutina $3,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Houve um aumento da corrente de pico catódica ao se aumentar o valor do pH de 5,0 a 7,0, mantendo-se constante em pH de 7,0 a 8,0 e diminuindo em pH de 8,0 a 9,0. Os resultados obtidos para o pH ótimo da atividade da peroxidase estão em concordância com os valores reportados na literatura¹⁸⁷. Portanto, o tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) foi usado para experimentos posteriores.

O efeito da frequência na resposta do biossensor proposto foi estudado variando este parâmetro de 5 a 100 Hz em solução de rutina $3,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e amplitude de potencial de 80 Hz. Um aumento do sinal analítico foi observado em 25 Hz. Este valor foi selecionado para estudos posteriores.

Posteriormente, foi avaliado a amplitude, variando de 5 a 100 mV. O maior valor de I_{pc} foi obtido para 30 mV em solução de rutina $3,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e frequência de 25 Hz. Foi selecionado amplitude de potencial de 30 mV. A Tabela 5 resume a faixa de cada variável investigada e os valores selecionados na utilização do biossensor proposto para rutina.

Tabela 5. Parâmetros de otimização do biossensor proposto.

Parâmetros	Faixa estudada	Maior resposta
pH	5,0 – 9,0	6,0
Frequência (Hz)	5 – 100	25
Amplitude de potencial (mV)	5 – 100	30
E_{pc}/V	+ 0,35 a – 0,10	+ 0,12

4.2.3 Repetibilidade, reprodutibilidade e seletividade

O estudo da repetibilidade foi realizado a partir de dez medidas sucessivas usando o biossensor em soluções de rutina $3,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, frequência de 25 Hz e amplitude de potencial de 30 Hz. Os valores obtidos de correntes de pico catódico foram determinados e o desvio padrão relativo encontrado foi de 0,9 % (n=10).

A reprodutibilidade do biossensor foi estudada para cinco diferentes biossensores e a resposta da corrente de pico catódica investigada em soluções de rutina $3,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, nos melhores parâmetros estudados. O desvio padrão relativo entre o I_{pc} obtido para cada biossensor construído foi de 2,5% (n=10). A boa reprodutibilidade pode estar relacionada com a eficiência na imobilização da peroxidase em matriz de quitosana previamente reticulada com glutaraldeído e epiclorigrina. Fernades *et al*¹⁷⁵ desenvolveram um biossensor de pasta de carbono contendo peroxidase imobilizada em matriz de quitina reticulada. No estudo da repetibilidade, o biossensor apresentou um desvio padrão relativo (r.s.d.) de 4 % e na reprodutibilidade um r.s.d. de 13 %.

A seletividade do biossensor proposto foi avaliada estudando-se o efeito das substâncias presentes nos produtos farmacêuticos. Compostos como cloreto de sódio, amido, polietilenoglicol, estearato de magnésio, lactose, sacarose foram estudadas individualmente usando o biossensor proposto nas proporções de 0,1, 1,0, 10,0 em relação a rutina $2,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Nenhuma dessas substâncias influenciou no procedimento proposto.

4.2.4 Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica de rutina

Os voltamogramas de onda quadrada usando o biossensor foram obtidos em uma faixa de potencial de + 0,35 a - 0,1 V, como mostra a Figura 32 (A). A partir da corrente de pico catódica foi construída a curva analítica mostrada na Figura 32 (B), os resultados apresentaram excelente coeficiente de correlação e linearidade de $3,4 \times 10^{-7}$ a $1,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ ($I_{pc} = 30,73 + 4,869 \times 10^7 [rutina]$; $r = 0,9998$), onde o I_{pc} é a corrente de pico catódico (nA) e [rutina] a concentração de rutina (mol L⁻¹) com um limite de detecção de $3,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

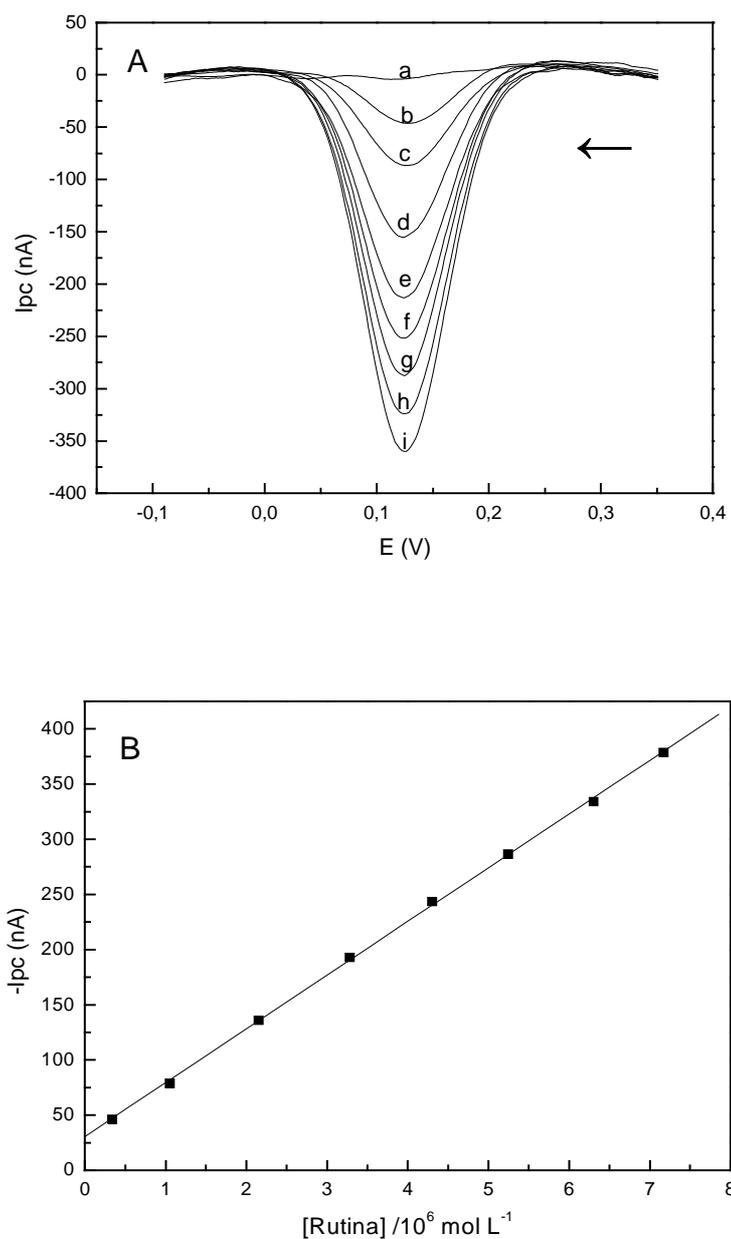


Figura 32. (A) Voltamogramas de onda quadrada (a) solução tampão fosfato e solução peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e adição de rutina: (b) $3,4 \times 10^{-7}$; (c) $1,1 \times 10^{-6}$; (d) $2,2 \times 10^{-6}$; (e) $3,3 \times 10^{-6}$; (f) $4,3 \times 10^{-6}$; (g) $5,2 \times 10^{-6}$; (h) $6,3 \times 10^{-6}$; (i) $7,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, amplitude de 30 mV e frequência de 25 Hz. (B) Curva analítica usando o I_{pc} dos voltamogramas de onda quadrada vs concentração de rutina.

4.2.5 Estudo de recuperação

O estudo de recuperação de rutina em duas amostras de fármacos foi realizado usando o biossensor proposto. Neste estudo, três concentrações de rutina, 0,63, 1,25 e 1,86 mg L⁻¹ foram adicionadas nas amostras dos fármacos e a cada adição foi realizada uma varredura de voltametria de onda quadrada. A partir do I_{pc} de cada voltamograma foi possível calcular o valor de recuperação de rutina padrão. Os resultados obtidos nestes experimentos, mostrados na Tabela 6, variaram de 96,2 a 102,4 % de recuperação de rutina padrão, evidenciando que não ocorre a interferência da matriz da amostra no método proposto.

Tabela 6. Estudo de recuperação de rutina em amostras farmacêuticas usando o biossensor proposto.

Amostras	Rutina (mg L ⁻¹)		Recuperado (%)
	Adicionado*	Determinado	
A	0,63	0,64	101,6
	1,25	1,28	102,4
	1,86	1,79	96,2
B	0,63	0,61	96,8
	1,25	1,22	97,6
	1,86	1,80	96,8

*(n=5)

4.2.6 Determinação de rutina em fármacos

Para avaliar a aplicabilidade do biossensor, foi determinado o teor de rutina em duas amostras: (A) Nova Rutina e (B) Rutina manipulada. A Tabela 7 mostra e compara os valores obtidos pelo método proposto, método comparativo e o valor rotulado. Os resultados obtidos em ambos os métodos estão em concordância entre si e com o valor rotulado, a um nível de confiança de 95% e dentro do erro aceitável para uma metodologia analítica.

Tabela 7. Determinação de rutina em amostras de fármacos usando o método comparativo e biossensor proposto.

Amostras	Rutina (mg g^{-1})			Erro relativo (Er) (%)	
	Valor rotulado	Método comparativo	Biossensor	Er ₁	Er ₂
A	20,0	20,60±0,06	19,70±0,08	- 4,4	-1,5
B	20,0	19,80±0,08	19,60±0,04	-1,0	-2,0

*n=6, nível de confiança de 95%.

Er₁= biossensor vs método comparativo; Er₂= biossensor vs valor rotulado.

Diversas técnicas têm sido propostas para a determinação de rutina¹⁴⁸⁻¹⁵³. Algumas destas envolvem procedimentos complicados, principalmente nas etapas de manipulação da amostra e eliminação de interferentes, aumentando o tempo e o custo da análise. O método espectrofotométrico proposto pela Official Methods of Analysis¹⁶⁴ usado como método comparativo neste trabalho, usa o comprimento de onda de 352,5 nm para determinação desta classe de antioxidantes. No entanto, os excipientes frequentemente usados nos produtos farmacêuticos absorvem na região

do UV, atuando como interferentes. Em contrapartida, o método proposto neste trabalho usando extrato de jiló como fonte da enzima peroxidase na construção do biossensor oferece diversas vantagens, entre elas, esse vegetal é rico em peroxidase, possui baixo custo e fácil aquisição. O biossensor combina a sensibilidade com seletividade proporcionada pela enzima, tornando as análises rápidas e com baixo limite de detecção, comparados com os métodos descritos na literatura¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Estes resultados abrem expectativas favoráveis do uso de biossensores para a determinação desta classe de antioxidantes presentes em diversos produtos farmacêuticos.

4.2.7 Comparação dos resultados obtidos usando o biossensor proposto na determinação de rutina e hidroquinona

A Tabela 8 compara os resultados da linearidade, equação da reta, limite de detecção e estudos de recuperação usando o biossensor (III) para a determinação de hidroquinona e rutina. Os resultados indicam boa eficiência do biossensor para ambos os substratos investigados, com ótimos valores de coeficiente de correlação. A variação do percentual de recuperação nas amostras reais confirma a ausência de interferentes nos métodos propostos, viabilizando o uso do biossensor para determinação de hidroquinona e rutina. Entretanto, os resultados diferem em relação à faixa de linearidade e conseqüentemente em relação ao limite de detecção para cada substrato. A rutina apresentou linearidade para concentrações mais baixas, comparada a hidroquinona. Essa diferença pode estar relacionada à maior afinidade da peroxidase pela rutina, conferindo ao biossensor maior sensibilidade na determinação deste flavonóide.

Tabela 8. Comparação das figuras de mérito usando o biossensor (III) na determinação de hidroquinona e rutina.

	Hidroquinona	Rutina
Linearidade (mol L ⁻¹)	$2,5 \times 10^{-4} - 4,5 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^{-7} - 1,2 \times 10^{-6}$
Equação da reta	$I_{pc} = 1,937 + 3,504 \times 10^4 [S^*]$ $r = 0,9994$	$I_{pc} = 30,73 + 4,869 \times 10^7 [S^{**}]$ $r = 0,9998$
Limite de detecção (mol L ⁻¹)	$2,0 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-8}$
Recuperação (%)	98,8 - 103	96,2 - 102,4

[S*] = hidroquinona, [S**] = rutina

4.3 SENSOR BIOMIMÉTICO USANDO NOVO COMPLEXO BINUCLEAR DE Cu^{II}

MODELO DA POLIFENOL OXIDASE

4.3.1 Complexo binuclear de Cu^{II}

Osório¹⁷⁰, com base nos dados espectroscópicos e estruturais da metaloenzima polifenol oxidase, buscou obter um composto similar ao sítio ativo desta enzima, sintetizando o complexo binuclear de Cu^{II} - [Cu₂(HL)(OAc)](ClO₄)₂, usando como ligante o H₂L - [N,N',N'-tris-(2-piridilmetil)-N-(2-hidroxi-3,5-di-terc-butilbenzil)1,3-ropanodiamina-2-ol]. A estrutura química do complexo foi resolvida por difração de raios X, caracterizando o produto conforme a estrutura proposta na Figura 33¹⁷⁰.

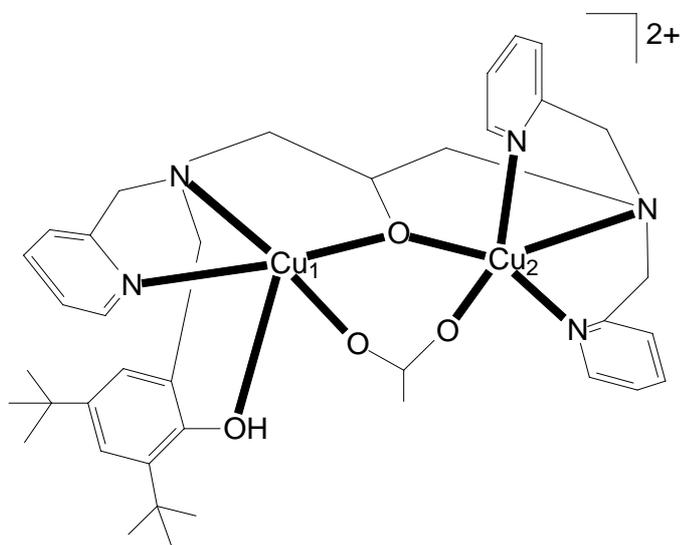


Figura 33. Estrutura do complexo binuclear [Cu₂(HL)(OAc)](ClO₄)₂¹⁷⁰.

A estrutura do complexo de Cu^{II} apresenta dois centros metálicos de Cu^{II} pentacordenados, um centro metálico possui geometria piramidal de base quadrada e o outro bipirâmide trigonal distorcida. Os centros metálicos se encontram a uma distância de 3,4 Å ligados por um grupo alcoóxido do ligante (HL) - e pelo íon acetato. As propriedades estruturais, eletroquímicas e espectroscópicas do complexo Cu^{II} foram devidamente estudadas e correlacionadas àquelas apresentadas pela catecol oxidase¹⁷⁰. Portanto, o complexo de Cu^{II} representa um modelo estrutural interessante para o sítio ativo da forma *met* da enzima catecol oxidase e conseqüentemente um composto interessante para ser empregado substituindo a enzima para construção do sensor biomimético.

4.3.2 Voltametria cíclica

Inicialmente, neste trabalho foram realizados experimentos de voltametria cíclica usando um eletrodo de pasta de carbono (Figura 34 A) e o sensor biomimético (Figura 34 B) como eletrodos de trabalho. Os experimentos foram realizados variando o potencial de + 0,6 a - 0,4 V, os voltamogramas (a, c) obtidos em solução tampão fosfato (pH 8,0) e (b, d) em hidroquinona $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato (pH 7,0). O voltamograma (c) usando o sensor biomimético, apresenta um processo de redução e oxidação em + 0,3 V e + 0,5 V, respectivamente. Estes picos podem estar relacionados à formação do radical fenoxil, que podem vir a contribuir no processo catalítico do complexo^{170,188,189}. O voltamograma (d) além dos picos do branco, apresenta também o processo de oxidação da hidroquinona a *o*-quinona em potencial de 0,0 V e um potencial de pico catódico devido a redução eletroquímica da quinona em - 0,2 V.

O eletrodo de pasta de carbono apresenta um processo redox bem definido, referentes a oxidação e redução da hidroquinona. Pode-se observar uma diferença significativa entre o Epa de 0,3 V apresentado pelo eletrodo de pasta de carbono e o Epa de + 0,0 V do sensor proposto. Além disso, o sensor biomimético apresentou um maior valor de Ipc para hidroquinona, estas características podem estar relacionadas à presença do complexo de Cu^{II} na composição do sensor, contribuindo para a oxidação de hidroquinona a p-quinona.

O sensor biomimético não apresentou nenhum processo redox na faixa de + 0,2 a - 0,4 V, pois conforme estudos eletroquímicos realizados anteriormente¹⁷⁰ o complexo de Cu^{II} apresenta dois processos redox ($\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}} \leftrightarrow \text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}} / \text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}} \leftrightarrow \text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$) em potencias acima de -0,4 V, não interferindo na determinação de hidroquinona que possui um Epc em -0,2 V. Estes resultados também viabilizam o uso do sensor biomimético para a quantificação de diversos compostos fenólicos, que apresentam processos redox em potencias próximos de zero, geralmente entre + 0,2 a -0,2 V⁹⁰.

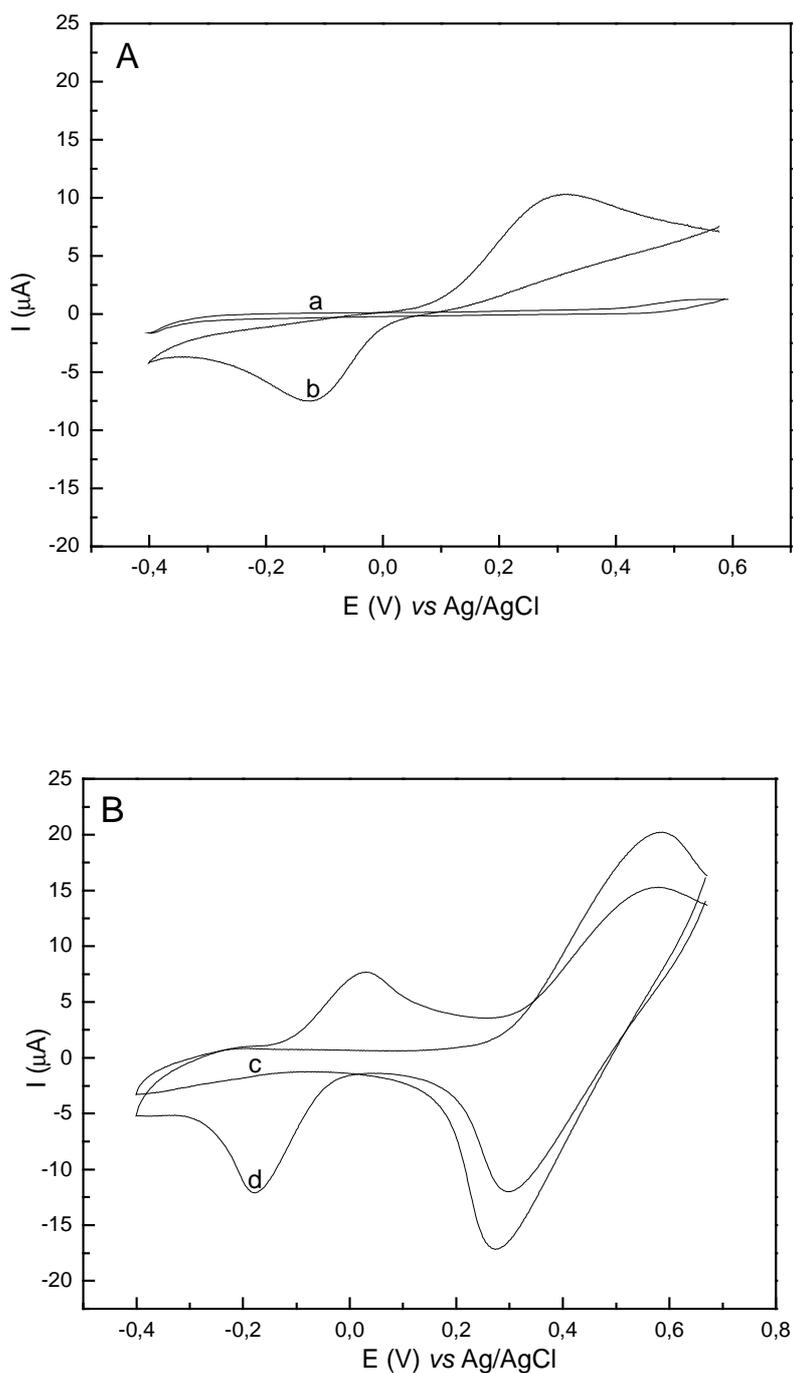


Figura 34. Voltamogramas cíclicos utilizando o (A) eletrodo de pasta de carbono e (B) sensor biomimético. Voltamogramas (a, c) obtidos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e (b, d) hidroquinona $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.3 Estudo do percentual do complexo de Cu^{II}

Com o objetivo de obter o máximo de corrente de pico e conseqüentemente uma maior resposta do sensor biomimético, foi investigado o percentual do complexo Cu^{II} na composição do sensor. Em estudos anteriores^{46,65}, foram registradas ótimas condições experimentais na construção de eletrodos de pasta de carbono na composição de 75/15 % (m/m) grafite/Nujol. Na construção do sensor biomimético esta composição foi mantida constante e foram construídos sensores variando o percentual do complexo de Cu^{II} de 5 a 20 % (m/m). A resposta analítica do eletrodo de pasta de carbono modificado foi investigada em solução de hidroquinona $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH (7,0) e a maior corrente de pico catódica dos voltamogramas foi obtida para o sensor na composição 75/15/10 % (m/m) grafite/Nujol/complexo de Cu^{II}, como mostra a Figura 35. Conseqüentemente, esta composição foi utilizada na construção do sensor biomimético.

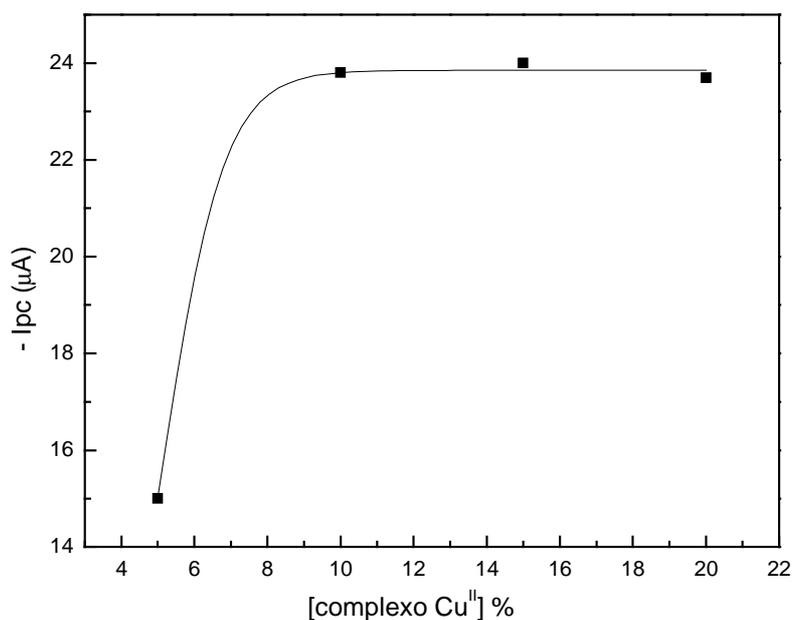


Figura 35. Estudo do percentual do complexo Cu^{II} de 5 a 20 % (m/m) do sensor biomimético em solução de hidroquinona $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH (7,0), amplitude de potencial 50 mV, frequência 50 Hz.

4.3.4 Efeito do pH sobre a resposta do sensor biomimético

A influência do pH de 5,0 a 9,0 sobre a resposta do sensor biomimético foi estudada em solução de hidroquinona $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, frequência de 50 mV e amplitude de potencial de 50 mV empregando a voltametria de onda quadrada nas mesmas condições experimentais. Nestas medidas, o máximo da corrente de pico catódica foi observado em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0), como mostra a Figura 36. Os experimentos a seguir foram realizados neste pH.

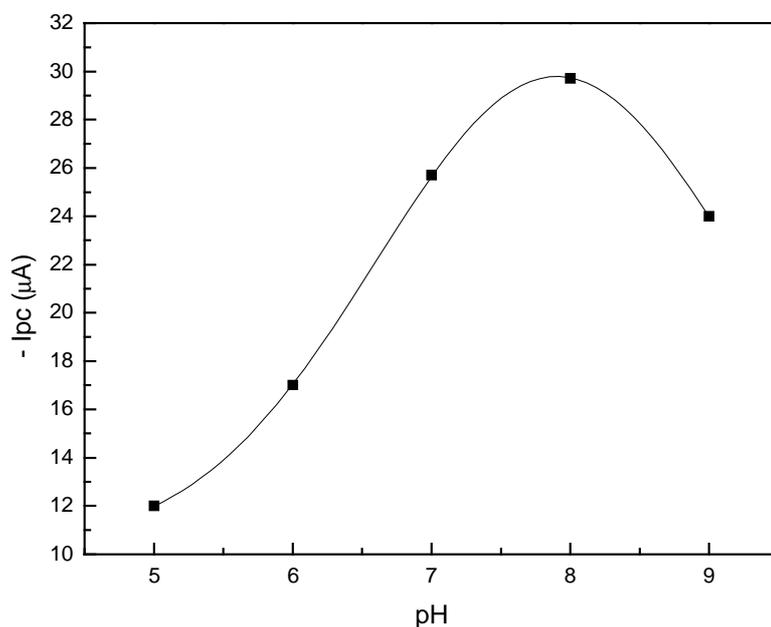


Figura 36. Estudo do pH (5 a 9) sobre a resposta do sensor biomimético em hidroquinona $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, frequência de 50 mV e amplitude de potencial de 50 mV.

4.3.5 Estudo dos parâmetros da voltametria de onda quadrada

A influência da frequência de 10 a 100 Hz sobre a resposta do sensor foi investigada em solução de hidroquinona $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ nas melhores condições determinadas anteriormente. Como mostra a Figura 37(A), um aumento significativo do valor I_{pc} é observado até 80 Hz, tornando-se praticamente constante para valores superiores. A amplitude de potencial foi estudada de 10 a 100 mV em solução de hidroquinona $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato $0,1$ mol L⁻¹ (pH 8,0). Um aumento significativo do sinal foi obtido até 80 mV, Figura 37(B). Estes valores foram selecionados para experimentos posteriores.

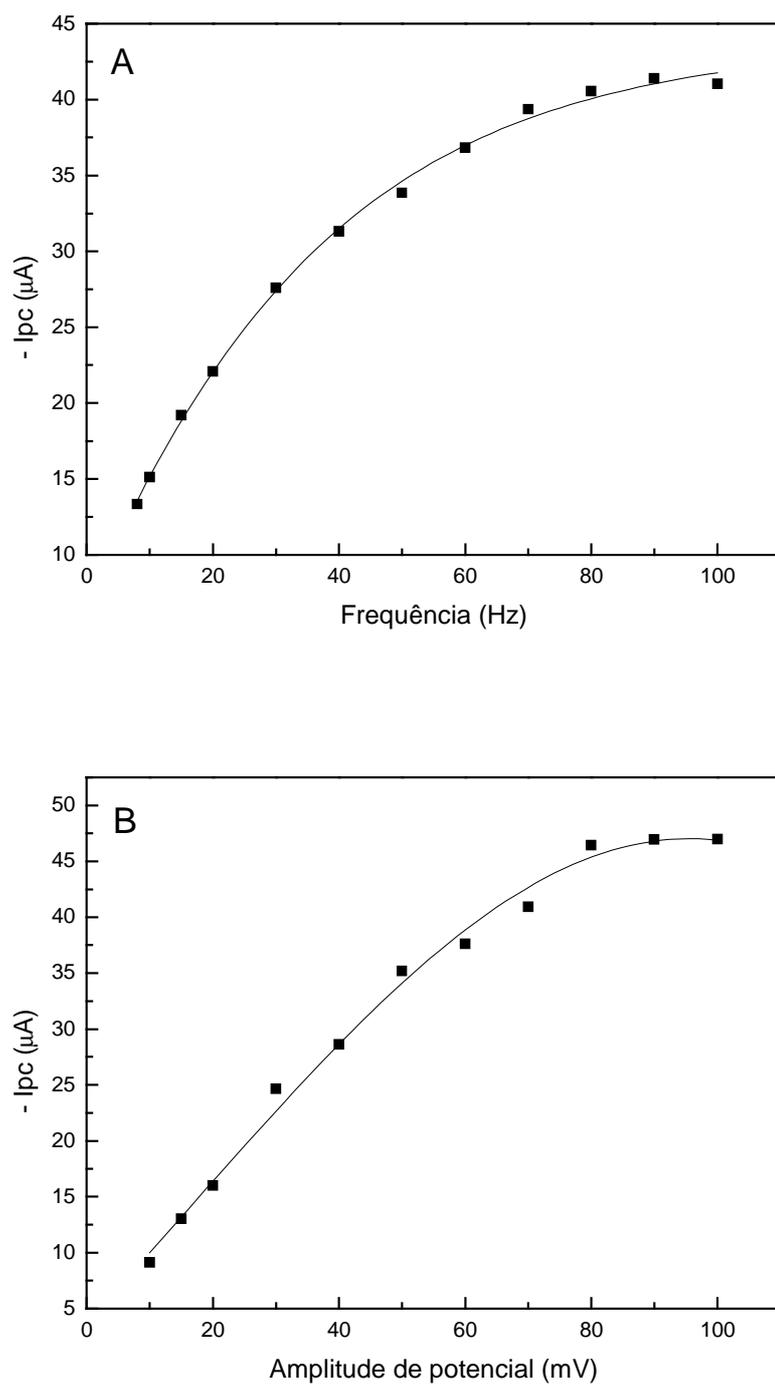


Figura 37. (A) Estudo do efeito da frequência de (10 a 100 Hz) e (B) amplitude de (10 a 100 mV) sobre o sinal analítico em solução de hidroquinona $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0).

4.3.6 Reprodutibilidade, repetibilidade e seletividade

Foram construídos três eletrodos de pasta de carbono modificados com o complexo Cu^{II} , nas mesmas condições. Em seguida, determinada a reprodutibilidade do sensor em solução de hidroquinona $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0), amplitude 80 mV e frequência de 80 Hz. O desvio padrão relativo nas determinações foi de 2,8 %.

O estudo da repetibilidade para o sensor biomimético contendo complexo de Cu^{II} , foi averiguado em 10 sucessivas medidas em solução de hidroquinona $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0), amplitude 80 mV e frequência de 80 Hz. O desvio padrão relativo encontrado para estas medidas foi menor que 2,0 %.

O efeito de excipientes, substâncias geralmente encontradas em cosméticos, tais como: ácido cítrico, estearato de magnésio, metilparabeno, polietileno glicol, foi avaliado usando o sensor proposto. As razões de concentrações entre a hidroquinona e as substâncias concomitantes foram fixadas em 0,1, 1,0 e 10,0. Nenhuma destas substâncias interferiu no método proposto.

4.3.7 Estudos de recuperação de hidroquinona em cosméticos

Para avaliar a presença de possíveis interferentes no procedimento proposto, foi aplicado o método de adição padrão. O percentual de recuperação de hidroquinona foi verificado a partir de três adições de hidroquinona padrão nas concentrações de 86,99; 143,14 e 202,60 mg L^{-1} em (A e B) e o voltamogramas de pico catódico obtidos. A partir do I_{pc} de cada adição foi possível calcular o percentual de hidroquinona, Tabela 9. O percentual de recuperação de hidroquinona

variou de 94,2 a 103,5 %, comprovando desta forma a ausência de interferência da matriz da amostra neste procedimento.

Tabela 9. Estudos de recuperação de hidroquinona utilizando o sensor biomimético.

Hidroquinona mg L ⁻¹			
Amostras	Adicionado*	Recuperado	Recuperado (%)
A	86,99	82,03	94,2
	143,14	148,2	103,5
	202,60	198,2	97,8
B	86,99	88,10	101,3
	143,14	145,34	101,5
	202,60	199,30	98,4

* (n=5)

4.3.8 Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica para a hidroquinona

Após estabelecer as melhores condições de operação do sensor biomimético, foi estudado o comportamento eletroquímico do sensor na redução eletroquímica da quinona utilizando a voltametria de onda quadrada. A Figura 38 mostra os voltamogramas referente a redução da quinona para hidroquinona em soluções padrão de $6,0 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

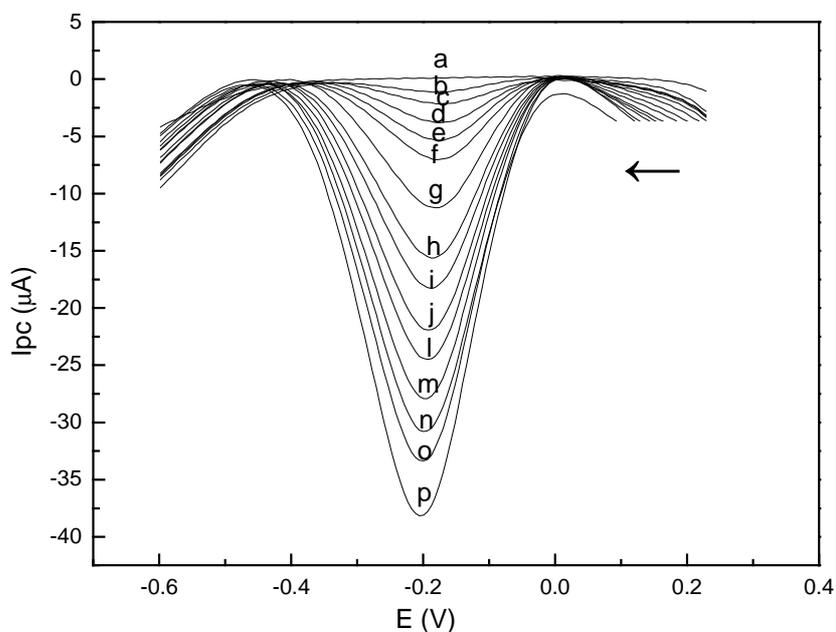


Figura 38. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o sensor biomimético

(a) solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH (8,0) e soluções de hidroquinona nas concentrações: (b) $6,0 \times 10^{-5}$; (c) $1,2 \times 10^{-4}$; (d) $2,4 \times 10^{-4}$; (e) $3,6 \times 10^{-4}$; (f) $4,7 \times 10^{-4}$; (g) $5,8 \times 10^{-4}$; (h) $8,0 \times 10^{-4}$; (i) $1,1 \times 10^{-3}$; (j) $1,3 \times 10^{-3}$; (l) $1,6 \times 10^{-3}$; (m) $1,8 \times 10^{-3}$; (n) $2,0 \times 10^{-3}$; (o) $2,2 \times 10^{-3}$; (p) $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, 80 mV e 80 Hz.

O i_{pc} destes voltamogramas foram usados na construção da curva analítica obtendo-se a equação da reta: $i_{pc}=1,50+1,47 \times 10^4 [\text{hidroquinona}]$; $r=0,9995$, onde o i_{pc} é expresso em μA e $[\text{hidroquinona}]$ é a concentração de hidroquinona em mol L^{-1} , Figura 39, obtendo-se um limite de detecção $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

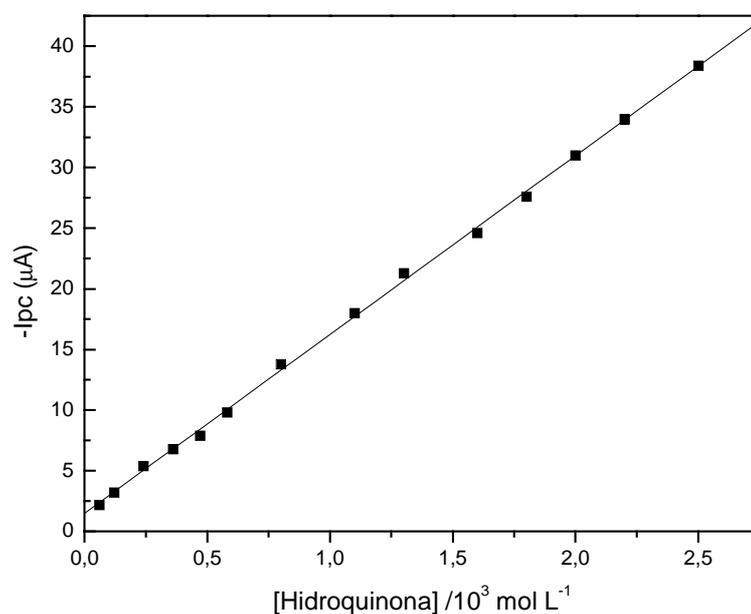


Figura 39. Curva analítica de hidroquinona usando o i_{pc} dos voltamogramas de onda quadrada vs concentração de $6,0 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH (8,0), amplitude de 80 mV e frequência de 80 Hz.

4.3.9 Determinação de hidroquinona em cosméticos

O procedimento proposto foi validado pela determinação de hidroquinona em cosméticos. A Tabela 10 mostra os resultados obtidos para duas amostras comerciais usando o método oficial¹⁶³ e o sensor proposto. Os resultados obtidos estão em concordância com o valor rotulado a um nível de confiança de 95 %.

Tabela 10. Determinação de hidroquinona usando o sensor biomimético e o método comparativo.

Amostra	Valor rotulado	Hidroquinona (mg L ⁻¹)		Erro relativo (%)	
		Método oficial	Sensor Biomimético	Er ₁	Er ₂
A	40,0	38,70 ± 0,06	38,90 ± 0,09	- 2,75	+ 0,52
B	40,0	39,10 ± 0,05	40,30 ± 0,05	+ 0,75	+ 3,1

*n=6, nível de confiança de 95%.

Er₁= sensor biomimético vs valor rotulado;

Er₂= sensor biomimético vs método comparativo

4.4 SENSOR BIOMIMÉTICO USANDO COMPLEXO DE Fe^{II}Fe^{III} MODELO FOSFATASE ÁCIDA PÚRPURA PARA A DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

4.4.1 Complexo Fe^{II}Fe^{III}

O complexo binuclear de ferro, [Fe^{II}Fe^{III}(BPBPMP)(OAc)₂ClO₄], foi sintetizado a partir do ligante 2-bis [2-((2-piridilmetil)-aminometil)-6-((2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil))-amino-metil]-4-metilfenol (H₂BPBPMP), modelo mimético para o sítio ativo da enzima fosfatase ácida púrpura. O complexo Fe^{II}Fe^{III} foi devidamente caracterizado por IR e CHN e teve suas propriedades redox investigadas por voltametria cíclica. Os voltamogramas obtidos apresentaram dois processos redox em + 0,38 e - 0,49 V vs NHE, que foram atribuídos aos pares redox Fe^{III}/Fe^{III} → Fe^{II}/Fe^{III} e Fe^{II}/Fe^{III} → Fe^{II}/Fe^{II}, respectivamente. O potencial de + 0,38V, torna o complexo de ferro sintetizado um análogo sintético das propriedades redox da uteroferrina (fosfatase ácida púrpura), uma vez que a mesma apresenta potencial redox em + 0,367 V vs NHE¹⁷³.

A proposta da estrutura química do complexo ilustrada na Figura 40 foi resolvida por difração de raios-x¹⁷³.

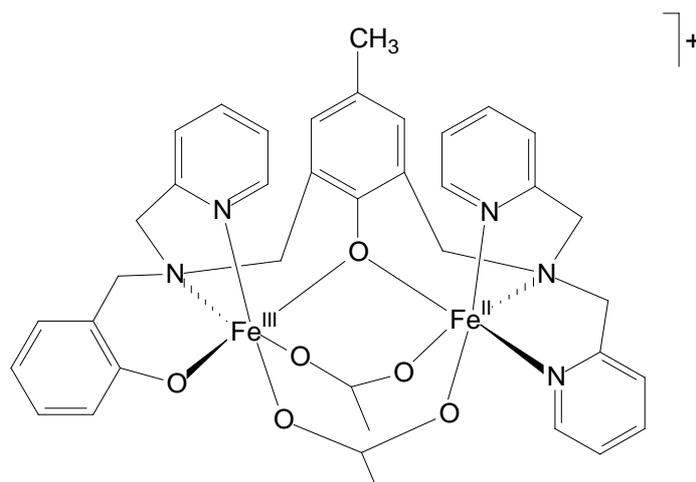


Figura 40. Proposta da estrutura do complexo $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$.

O complexo $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$, apresenta uma estrutura com dois átomos de ferro hexacoordenados, com distância entre si de 3,5 Å. Os centros metálicos estão unidos por uma ponte fenóxido proveniente do ligante H_2BPBPMP e duas pontes carboxilato dos grupos acetato. O Fe^{III} encontra-se coordenado a um $\text{N}_{\text{piridínico}}$, um $\text{N}_{\text{amínico}}$ e um $\text{O}_{\text{fenólico}}$ e o Fe^{II} coordena-se a dois $\text{N}_{\text{piridínicos}}$ e um $\text{N}_{\text{amínico}}$, completando o ambiente de coordenação do complexo^{172,173}. Este complexo foi utilizado na construção do sensor biomimético e avaliado para determinação de compostos fenólicos em presença de peróxido de hidrogênio e na determinação de dopamina em produtos farmacêuticos.

4.4.2 Voltametria cíclica

Foram realizados experimentos de voltametria cíclica para investigar o processo de oxidação e redução da dopamina usando o sensor biomimético contendo o complexo de $Fe^{II}Fe^{III}$ e o desempenho deste sensor comparado ao eletrodo de pasta de carbono. A Figura 41, mostra os voltamogramas cíclicos utilizando o (A) eletrodo de pasta de carbono e (B) sensor biomimético. Os voltamogramas (a, c) foram obtidos em peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e voltamogramas (b, d) em dopamina $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas (b, d) apresentam um processo de oxidação da dopamina para dopaminoquinona em potenciais próximos de + 0,4 V. E a redução eletroquímica a respectiva dopamina foi verificada no voltamograma (b) em 0,0 V e (d) em 0,05 V. Como pode ser observado, o sensor biomimético apresentou maior valor de I_{pc} para dopamina em relação ao eletrodo de pasta de carbono. O pequeno deslocamento do E_{pc} para potenciais mais positivos e a maior resposta analítica apresentado pelo sensor biomimético, pode estar relacionado a presença do complexo de $Fe^{II}Fe^{III}$ na composição do sensor, favorecendo para a oxidação de dopamina a correspondente o-quinona. O voltamograma (c) obtido usando o sensor biomimético mostra um processo redox em presença de peróxido de hidrogênio, este sinal pode estar relacionado à formação de radicais e/ou ao processo redox $Fe^{II}/Fe^{III} \rightarrow Fe^{II}/Fe^{II}$. Entretanto, este processo não interferiu na determinação de compostos fenólicos usando a voltametria de onda quadrada, resultados mostrados a seguir.

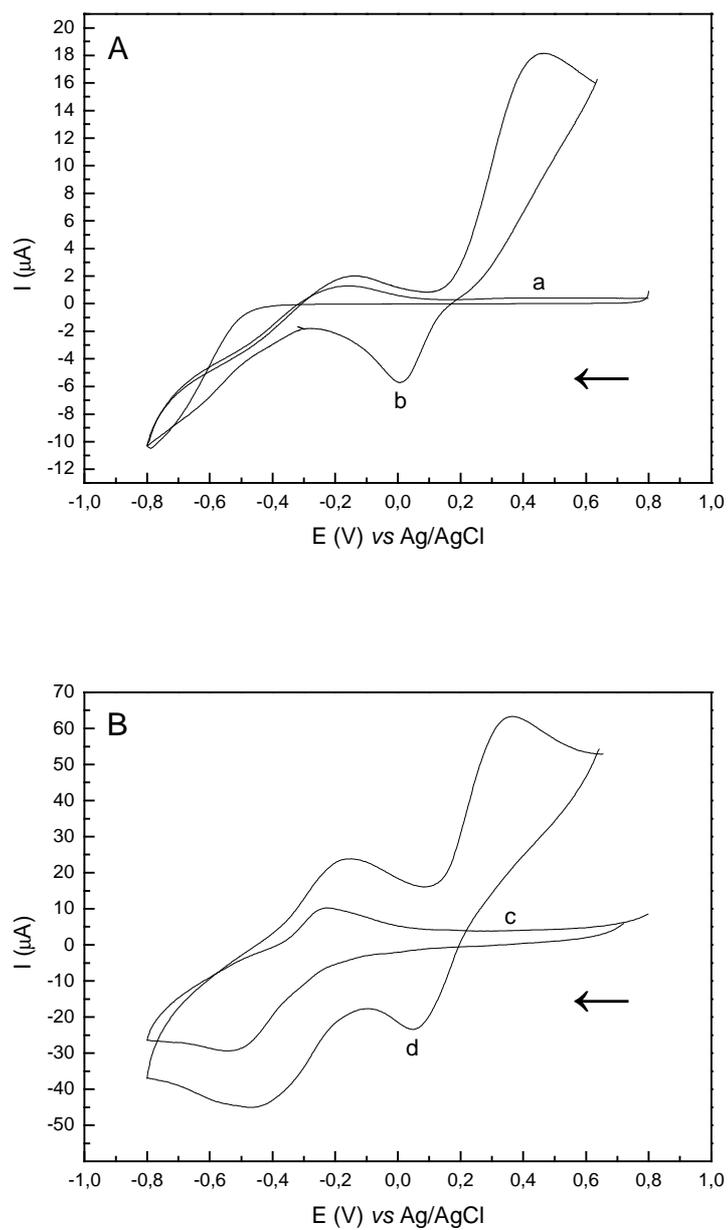


Figura 41. Voltamogramas cíclicos utilizando (A) eletrodo de pasta de carbono e (B) sensor biomimético. Voltamogramas (a, c) obtidos em peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e voltamogramas (b, d) adição de dopamina $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

4.4.3 Estudo do percentual do complexo $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$

A influência do complexo $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ na composição do sensor biomimético foi investigada de 5 a 20 % (m/m). Neste estudo, foi mantida constante a quantidade de grafite:nujol em 75:15 % (m/m). A Figura 42 mostra o sinal analítico para os sensores em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo dopamina $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O maior valor de I_{pc} foi obtido para 10 % (m/m) do complexo $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$, esta proporção foi usada na construção do sensor biomimético.

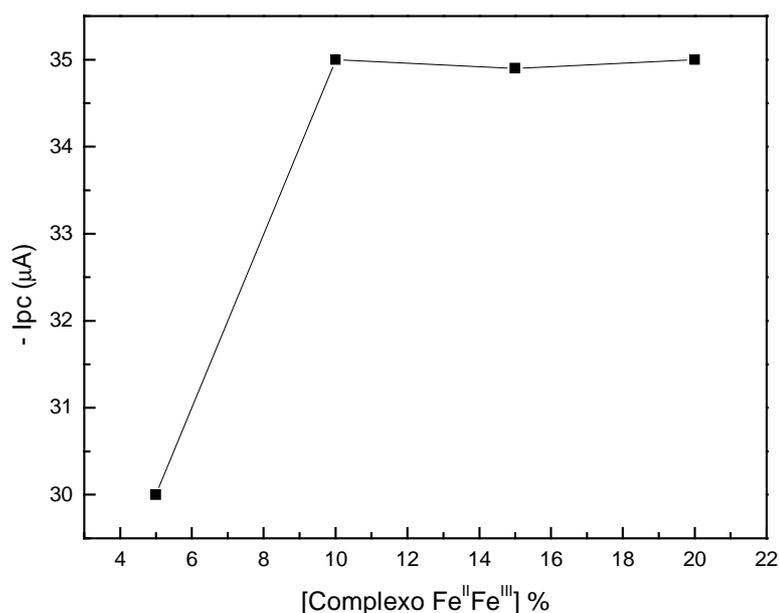
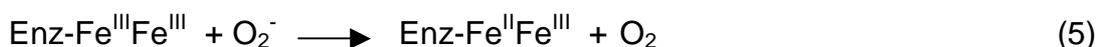


Figura 42. Estudo do percentual do complexo $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ de 5 a 20 % (m/m) sobre a resposta do sensor biomimético em solução de dopamina $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH (7,0), amplitude de potencial 50 mV, frequência 50 Hz.

4.4.4 Influência do peróxido de hidrogênio

As fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) de tecidos animais e seus modelos sintéticos possuem no sítio ativo $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ responsável pela atividade catalítica destas enzimas. Diversos pesquisadores propõem que as PAPs são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio pela reação de Fenton em presença de peróxido de hidrogênio, como mostra as equações (3, 4 e 5). Essas reações ocorrem preferencialmente em pH 7,0 e é dependente da concentração de peróxido de hidrogênio e do estado de oxidação do ferro¹⁹⁰⁻¹⁹³.



Verificando a possibilidade de ocorrer a reação de Fenton usando o modelo sintético para PAP, investigou-se o efeito da concentração do peróxido de hidrogênio sobre a resposta do sensor biomimético contendo $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$. A concentração de peróxido de hidrogênio foi estudada de 0,0 a $9,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ usando solução de dopamina $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, Figura 43. Observa-se um aumento do I_{pc} até $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio, permanecendo constante para concentrações superiores. Com base nos resultados obtidos para este estudo e conforme citado por outros pesquisadores³⁵, a atividade catalítica da PAP pode assemelhar-se à enzima peroxidase, que catalisa a oxidação de compostos fenólicos em presença de peróxido de hidrogênio. Portanto, na etapa seguinte deste trabalho, será investigada a resposta do sensor biomimético para

diversos compostos fenólicos em solução de peróxido de hidrogênio $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 7,0).

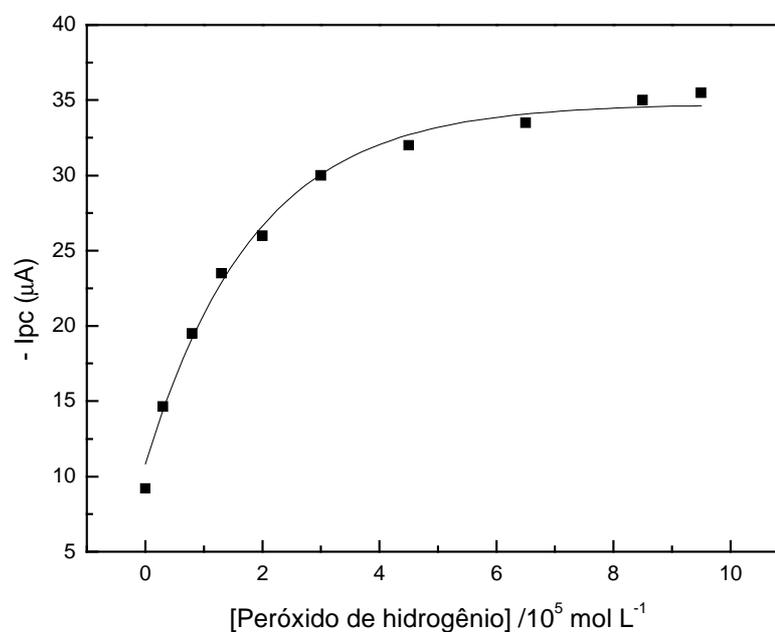
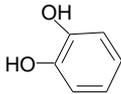
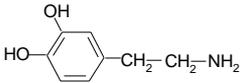
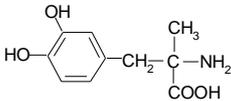
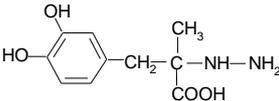
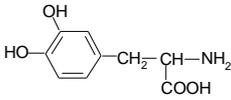


Figura 43. Influência da concentração do peróxido de hidrogênio ($0,0$ a $9,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) sobre a resposta do sensor biomimético em dopamina $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

4.4.5 Resposta do sensor biomimético para compostos fenólicos

Foi realizado estudo comparativo para verificar a resposta para alguns compostos fenólicos (carbidopa, catecol, dopamina, hidroquinona, L-dopa e metildopa). O estudo foi realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo peróxido de hidrogênio $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e concentração de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para cada substrato. A Tabela 11 apresenta o potencial de pico catódico (Epc) e a resposta relativa (%) para cada composto fenólico, valor determinado a partir da corrente de pico catódica (Ipc). O sensor apresentou maior sensibilidade para hidroquinona (100 %), catecol (80,6 %) e dopamina (32,3 %) e menor para metildopa (3,9 %), carbidopa (3,7 %) e L-dopa (3,3 %). Todos os compostos estudados apresentaram sinal do Epc próximo de + 0,1 V. O potencial próximo entre os compostos selecionados, inviabiliza a determinação simultânea desses compostos. Entretanto, viabiliza a determinação destes compostos usando o sensor biomimético, pois cada substrato possui funções diferentes e são comercializados separadamente. Neste trabalho, foi selecionada a dopamina para a otimização e aplicação do sensor proposto.

Tabela 11. Resposta relativa para compostos fenólicos usando o sensor biomimético.

Substrato fenólico	Estrutura	Epc (V)	Resposta relativa (%)
Hidroquinona		0,00	100
Catecol		+ 0,10	80,6
Dopamina		+ 0,10	32,3
Metildopa		+ 0,12	3,9
Carbidopa		+ 0,10	3,7
L-dopa		+ 0,10	3,3

4.4.6 Influência do pH

O pH pode ser considerado um dos parâmetros que mais influência na performance do sensor biomimético. O efeito do pH de 3,0 a 8,0 foi estudado em dopamina $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e peróxido de hidrogênio $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. De acordo com os resultados obtidos, Figura 44, a maior resposta analítica foi obtida em pH 7,0. Conseqüentemente, este pH foi utilizado no decorrer do trabalho. Este resultado esta de acordo com aqueles obtidos com as enzimas fosfatases ácidas que operam na faixa ótima de pH entre 2 a 7¹⁹¹.

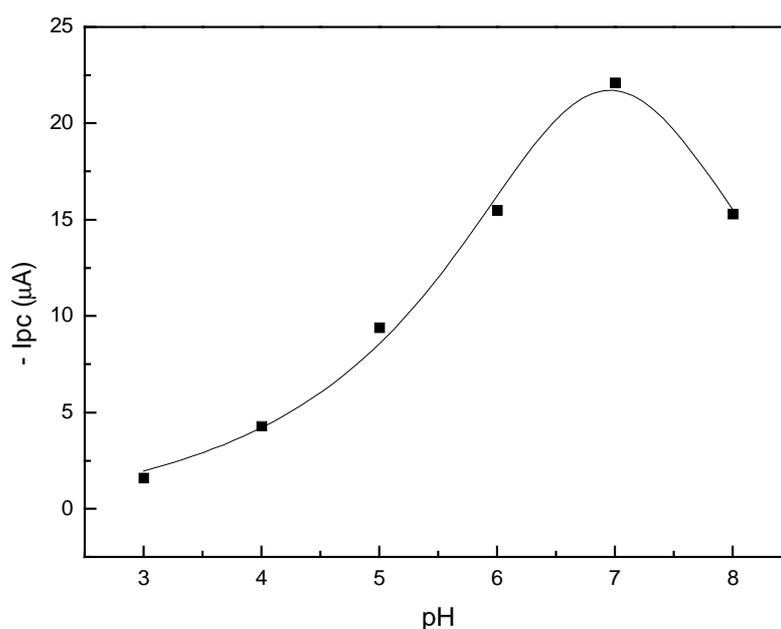


Figura 44. Influência do pH (3,0 a 8,0) sobre a resposta do sensor biomimético em dopamina $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e peróxido de hidrogênio $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, frequência de 50 Hz e amplitude de potencial de 50 mV.

4.4.7 Parâmetros da voltametria de onda quadrada

A influência da amplitude de potencial no desempenho do sensor proposto foi investigado variando este parâmetro de 10 a 100 mV. Como pode ser observado na Figura 45 (A), o valor de I_{pc} aumenta com o aumento da amplitude. Uma amplitude de 50 mV foi usada nos experimentos seguintes.

O efeito da frequência de 10 a 100 Hz foi estudado usando o sensor biomimético como eletrodo de trabalho em solução de dopamina $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, nos melhores parâmetros estudados, resultados mostrados na Figura 45 (B). O maior sinal analítico foi obtido para 30 Hz e este valor foi selecionado para os próximos experimentos.

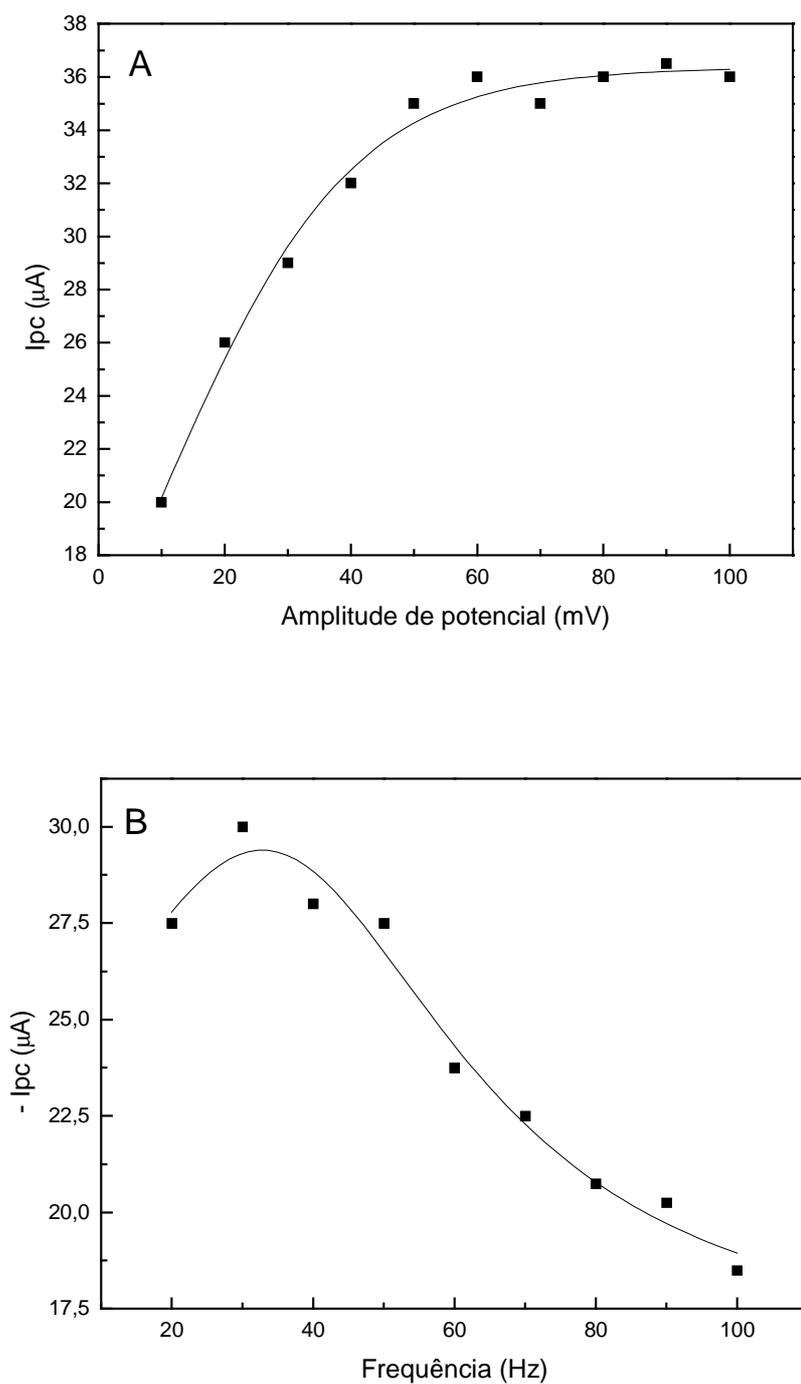


Figura 45. Estudo da (A) amplitude de potencial (10 a 100 mV) e (B) freqüência de (20 a 100 Hz), em solução de hidroquinona $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e peróxido de hidrogênio $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

4.4.8 Repetibilidade, reprodutibilidade e interferentes

O método de voltametria de onda quadrada foi usado para o estudo da repetibilidade, reprodutibilidade e na determinação de dopamina usando o sensor proposto. Essas medidas foram realizadas usando a composição do sensor biomimético de 75/15/10 % (m/m/m) grafite/Nujol/complexo de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$) e as melhores condições determinadas anteriormente (pH 7,0, frequência 30 Hz, amplitude de potencial 50 mV).

A repetibilidade do sensor foi avaliada em 10 sucessivas medidas em $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de dopamina e $4,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹; pH 7,0. Foi obtido um desvio padrão relativo de 2,6 %, indicando que o sensor proposto possui alta repetibilidade.

A reprodutibilidade do sensor foi medida a partir da construção de três sensores nas mesmas condições, em $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de dopamina e $4,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹; pH 7,0. Obteve-se um desvio padrão relativo entre as medidas de 6,1 %.

A influência de possíveis interferentes no procedimento proposto foi avaliada pelo método de adição de padrão. Neste estudo foram adicionadas concentrações de 0,237; 0,474 e 0,664 mg L⁻¹ de solução de dopamina na amostra do produto farmacêutico, obtendo o I_{pc} após cada adição de padrão. O percentual de dopamina recuperada usando o sensor biomimético variou de 98,3 a 103 %, como mostra a Tabela 12. Os resultados obtidos sugerem a ausência do efeito de matriz nestas determinações.

Tabela 12. Estudos de recuperação de dopamina padrão.

Amostra	Dopamina (mg mL ⁻¹)		Recuperado (%)
	Adicionado*	Encontrado	
A	0,237	0,241	102
	0,474	0,488	103
	0,666	0,655	98,3

*(n=5)

4.4.9 Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica da dopamina

Após estabelecer as melhores condições para a determinação de dopamina, foi construída a curva analítica usando o sensor biomimético. A Figura 45, mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ a $6,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de dopamina. A partir do I_{pc} de cada voltamograma, foi construída a curva analítica, obtendo-se a seguinte equação da reta: ($I_{pc} = 3,0013 + 5142,8$ [dopamina]); ($r=0,9993$) e limite de detecção de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

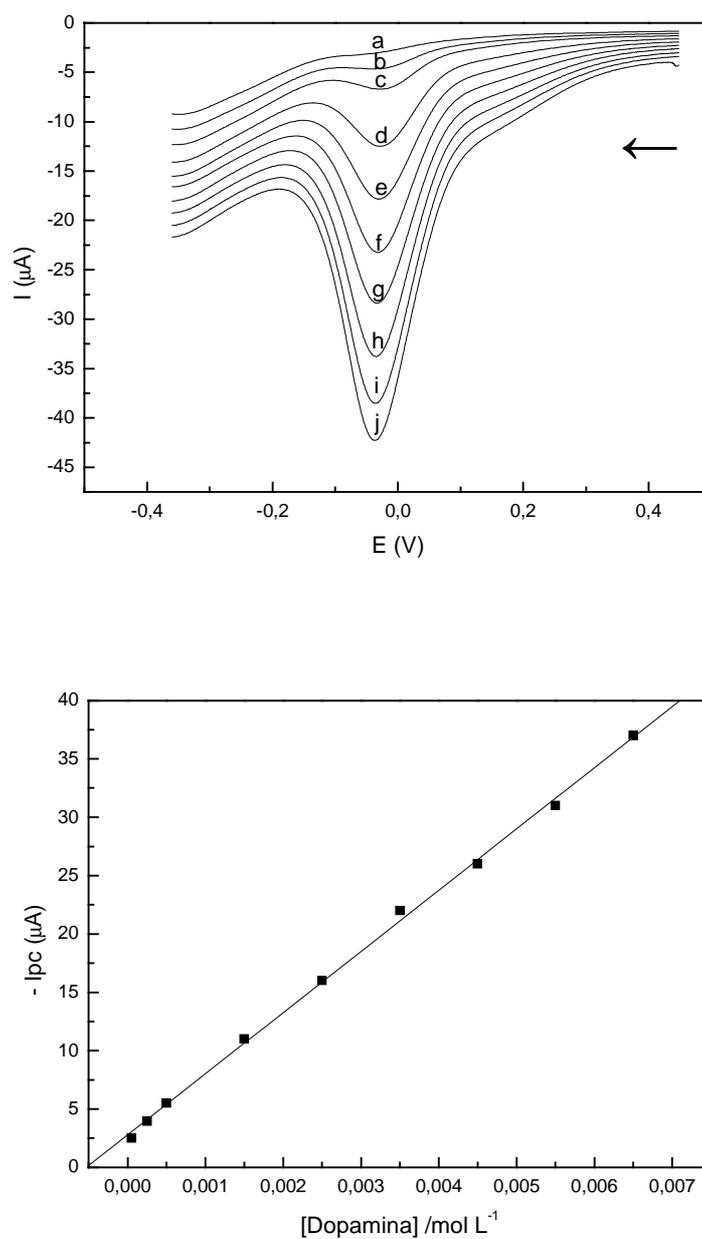


Figura 46. Voltamogramas de onda quadrada usando o sensor biomimético (a) tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), e soluções de dopamina nas concentrações de (b) $5,0 \times 10^{-5}$; (c) $2,5 \times 10^{-4}$; (d) $5,0 \times 10^{-4}$; (e) $1,5 \times 10^{-3}$; (f) $2,5 \times 10^{-4}$; (g) $3,5 \times 10^{-4}$; (h) $4,5 \times 10^{-4}$; (i) $5,5 \times 10^{-3}$; (j) $6,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, amplitude de potencial 50 mV e frequência de 30 Hz.

4.4.10 Determinação de dopamina em produto farmacêutico

O método proposto foi validado, aplicando-o na determinação de produto farmacêutico contendo dopamina. A diferença entre os resultados apresentados na Tabela 13, não são significativos, comparados com os resultados usando o método comparativo¹⁶⁵, concluindo-se que o método proposto é adequado para determinação de dopamina em amostras comerciais.

Tabela 13. Determinação de dopamina em produtos farmacêuticos usando o método comparativo¹⁶⁵ e o sensor biomimético.

Amostra	Dopamina (mg mL ⁻¹)				Erro relativo (%)	
	Valor rotulado	Método comparativo	Sensor biomimético	R _{e1}	R _{e2}	
	A	5,0	5,02±0,09	5,13±0,05	+ 2,6	+ 2,2

*n=6; nível de confiança de 95 %.

R_{e1}= sensor biomimético vs valor rotulado;

R_{e2}= sensor biomimético vs método comparativo.

5. CONCLUSÕES

Entre os vegetais selecionados para obtenção da peroxidase, o extrato da fruta-do-conde (*Ananas squamosa*), gengibre (*Zingiber officinales Rosc.*) e jiló (*Solanum gilo*) apresentaram atividades específicas superiores aos outros vegetais estudados. O jiló foi selecionado e usado como fonte da enzima peroxidase na imobilização em matriz de quitosana. As melhores condições de extração para este vegetal foram obtidas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). A atividade da peroxidase do homogenato de jiló manteve-se estável durante 25 dias de estocagem e não foram observadas mudanças significativas na atividade desta enzima no processo de extração usando tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) + Polyclar. O grau de desacetilação da quitosana foi determinado por titulação condutométrica obtendo-se uma porcentagem de grupos amino livres de 82 %. O máximo de reticulação, 100 %, foi obtido em solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v) a partir de 10 min de reação.

A quitosana apresentou boa eficiência como suporte para imobilização da peroxidase obtida do vegetal jiló. Esse bom desempenho foi obtido a partir da reticulação com glutaraldeído, epícloridrina e ativação com carbodiimida que permitiu maior estabilidade para a peroxidase imobilizada.

Os biossensores (I, II e III) desenvolvidos a partir da imobilização da peroxidase em matriz de quitosana previamente reticulada e ativada, apresentaram uma relação linear entre as correntes catódicas e as concentrações de hidroquinona no intervalo de $2,5 \times 10^{-4}$ a $4,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com limite de detecção de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A maior sensibilidade foi observada para o biossensor (III), que foi construído a partir da imobilização da peroxidase em quitosana contendo os grupos amino reticulados com glutaraldeído e grupos hidroxila ativados com epícloridrina.

Os biossensores (I), (II) e (III) apresentaram bons resultados quanto à repetibilidade (r.s.d. \leq 1,0 %), reprodutibilidade (r.s.d. \leq 3,2 %). Esta boa estabilidade pode ser atribuída à forte interação entre a enzima peroxidase e a matriz da quitosana ativada e reticulada. Os estudos de recuperação, assim como a determinação de hidroquinona em amostras reais, comprovaram o bom desempenho dos sensores propostos e indicaram que os procedimentos analíticos não sofrem interferências das matrizes dessas amostras.

O biossensor (III) foi otimizado para determinação de rutina em fármacos e os resultados comparados com aqueles obtidos na determinação de hidroquinona. O biossensor apresentou características favoráveis para determinação de rutina, incluindo alta sensibilidade, boa reprodutibilidade (r.s.d \leq 2,5 %), boa repetibilidade (r.s.d \leq 0,9 %). Na determinação de rutina, o biossensor apresentou linearidade e limite de detecção para concentrações menores, comparado a hidroquinona. Essa diferença pode estar relacionada à maior afinidade da peroxidase pela rutina, conferindo ao biossensor maior seletividade e sensibilidade na determinação deste flavonóide.

Os resultados obtidos neste trabalho viabilizam o uso da peroxidase de extrato de jiló na construção de biossensores, podendo substituir a enzima peroxidase purificada. Os resultados obtidos usando os biossensores (I, II e III) viabilizam a utilização destes eletrodos modificados para determinação de compostos fenólicos, necessitando somente da devida otimização para cada substrato de interesse.

O sensor biomimético contendo complexo de Cu^{II} (modelo catecol oxidase) foi empregado com sucesso na determinação de hidroquinona em cosméticos, confirmando que sistemas enzimáticos altamente complexos podem ser substituídos satisfatoriamente por moléculas mais simples. O sensor proposto apresentou boa

reprodutibilidade (r.s.d \leq 2,8 %), boa repetibilidade (r.s.d \leq 1 %) e resposta linear para hidroquinona de $6,0 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

O sensor biomimético desenvolvido a partir do complexo binuclear de ferro, apresentou resposta para vários compostos fenólicos na presença de peróxido de hidrogênio. O sensor proposto apresentou uma linearidade de $5,0 \times 10^{-5}$ a $6,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para dopamina e limite de detecção de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, apresentando bons resultados em relação a reprodutibilidade (r.s.d \leq 6,1 %) e repetibilidade (r.s.d \leq 2,6 %) do sensor.

O tempo de vida dos biossensores e sensores biomiméticos foram investigados durante 180 dias. Não foi observada uma alteração significativa no desempenho destes sensores. Esta boa estabilidade dos biossensores (I, II e III) pode ser atribuída à imobilização adequada da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana e dos sensores biomiméticos a estabilidade do composto biomimético empregado na construção do sensor.

Os sensores biomiméticos empregando complexos modelos polifenol oxidase e fosfatase ácida púrpura, apresentaram bom desempenho na determinação de compostos fenólicos, em ampla faixa de concentração e limites de detecção menor aos encontrados usando os biossensores contendo peroxidase de vegetal imobilizada em matriz de quitosana previamente reticulada. Entretanto, os biossensores e os sensores biomiméticos desenvolvidos neste trabalho oferecem uma alternativa para determinação de compostos fenólicos com alta precisão e exatidão. Além disso, a construção destes eletrodos de pasta de carbono modificados, são facilmente preparados, apresentam baixo custo, rapidez nas análises, sensibilidade e estabilidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Voet, D.; Voet, J.G.; Biochemistry, John Wiley & Sons, New York, 1998, p. 331.
2. Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L.; Biochemistry, W.H. Freeman and Company, New York, 2001, p. 189.
3. Leadlay, P.F.; DPhil, M.A.; An Introduction to Enzyme Chemistry, Department of Biochemistry, Oxford University. Cambridge, 1993, p.190.
4. Lehninger, A. L.; Princípios de Bioquímica, Sarvier, São Paulo, 1986, p.154.
5. Whitaker, J.R.; Principles of Enzymology for the Food Sciences, Marcel Dekker, New York, 1985, p.592.
6. Robinson, D.S.; Peroxidase and Catalases in Food, In: D.S. Robinson and N.A.M. Eskin (Eds.), Oxidative Enzymes in Food, Elsevier Applied Science, New York, 1991, p.1.
7. Dunford, H.B.; Horseradish Peroxidase: Structure and Kinetic Properties, In: K. Everse and M. B. Grisham (Eds), Peroxidase in Chemistry and Biology, CRC Press, New York, Vol. II, 1991, p. 1.
8. Campa, A.; Biological Roles of Plant Peroxidases: Know and Potential Function, In: K. Everse and M. B. Grisham (Eds), Peroxidase in Chemistry and Biology, CRC Press, New York, Vol. II, 1991, p. 1.

9. Dunford, H.B.; Stillman, J.S., On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coord. Chem. Reviews* **1976**, 19, 187-193.

10. Vámos-Vigyázo, L.; Polifenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critical Reviews in Food Sci. Nutrition* **1981**, 49-127.

11. Brunetti, J.L.; Faria-Oliveira, O.M.M.; Sistemas quimiluminescentes com peroxidase E.C.:1.11.1.7 e suas aplicações em análises clínicas. *Rev. Ciênc. Farm.* **1981**, 15, 49-52.

12. Lee, C.Y.; Penessi, A.P. Smith, N.L. Purification and some properties of peroxidase from de chaunac grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **1983**, 34, 128-129.

13. Lee, H.C.; Klein, B.P.; A simple method of identifying peroxidase isoenzymes from crude pea seed extracts. *Food Chem.* **1988**, 29, 275-282.

14. Moulding, P.H.; Grant, H.F.; Mclellan, K.M.; Robinson, D.S.; Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1987**, 22, 391-397.

15. Soda, I.; Hasegawa, T.; Suzuki, T.; Ogura, N.; Purification and some properties of peroxidase from kiwi fruit. *Agric. Biol. Chem.* **1991**, 55, 1677-1678.

16. Civello, P.M.; Martínez, G.A.; Chaves, A.R.; Anon, M.C.; Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa Duch*). *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 2596-2601.

17.Santos, E.R.; Caracterização bioquímica da peroxidase e polifenol oxidase de açaí *Euterpe oleracea*. Dissertação de Mestrado - Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

18.Bouel, G.; Bauw, G.; Legrand, B.; Rambour, S.; Purification and characterization of a basic peroxidase from the medium of cell suspension cultures of chicory. *Plant Physiol. Biochem.* **2000**, 38, 217-224.

19.Duarte-Vázquez, M.A.; García-Almendárez, B.E.; Regalado, C.; Whitaker, J.R.; Purification and properties of a neutral peroxidase isoenzyme from turnip (*Brassica nabus* L. var. purple top white globe) roots. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 4450-4456.

20.Holschuh, H.J.; Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.). Tese (Doutorado em Ciência de alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 2000.

21.López-Serrano, M.; Purification and characterization of a basic peroxidase isoenzyme from strawberries. *Food Chem.* **1996**, 55, 133-137.

22.Lourenço, E.; Neves, V. A.; Peroxidase solúvel de pêssigo: purificação parcial e propriedades. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1997**, 17, 42-48.

23.Forsyth, J.L.; Robinson, D.S.; Purification of Brussels sprout isoperoxidases. *Food Chem.* **1998**, 63, 227-234.

- 24.Loughlin, W.A.; Biotransformation in organic synthesis. *Bioresour Technol.* **2000**, 74, 49-62.
- 25.Tong, Z.; Qingxiang, Z.; Hui, H.; Qin, L.; Yi, Z.; Removal of toxic phenol and 4-chlorophenol from wastewater by horseradish peroxidase. *Chemosphere* **1997**, 34, 893-903.
- 26.Fatibello-Filho, O.; Vieira, I.C.; L-Ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, 11, 412-418.
- 27.Miland, E.; Smyth, M.R.; Fagain, C.O.; Modification of horseradish peroxidase with bifunctional N-hydroxysuccinimide esters: Effects on molecular stability. *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, 19, 242-249.
- 28.Fox, P.F.; *Food Enzymology*, vol. I, University College Cork, Ireland, 1998, 399-423.
- 29.Myrback, K.; *The enzymes, Chemistry and Mechanism of Action*, Vol. II, Academic Press, New York, 1951, 401-428.
- 30.Lupetti, K.O.; Ramos, L.A.; Fatibello-Filho, O.; Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea americana*). *Quim. Nova* **2003**, 26, 1997-201.

31. Gerdemann, C.; Eicken, B.; Krebs, B. The crystal Structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 183-191.
32. Neves, A.; Erthal, S.M.D.; Drago, V.; Griesar, K.; Haase, W.; A new N,O-donor binucleating ligand and its first iron(III) complex as a model for the purple acid phosphatases, *Inorg. Chim. Acta* **1992**, 197, 121- 124.
33. Than, R.; Feldmann, A.; Krebs, B.; Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatases and catechol oxidases. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 182, 211-241.
34. Lanznaster, M.; Neves, A.; Bortoluzzi A.J.; Szpoganicz, B.; Schwingel, E.; New (FeZnII)-Zn-III complex containing a single terminal Fe-O-phenolate bond as a structural and functional model for the active site of red kidney bean purple acid phosphatase. *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 5641-5643.
35. Mitic, N.; Smith, S.J.; Neves, A.; Guddat, L.W.; Gahan, L.R.; Schenk, G.; The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3338-3363.
36. Klabude, T.; Krebs, B.; The dimetal center in purple acid phosphatases. *Structure and Bonding* **1997**, 89, 177-198.
37. Ketcham, C.M.; Baumbach, G.A.; Bazer, F.W.; Roberts, R.M.; The type 5, acid phosphatase from spleen of humans with hairy cell leukemia. Purification,

properties, immunological characterization and comparison with porcine uteroferrin. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 5768-5776.

38. Reinholt, F.P.; Hulthenby, K.; Oldberg, A.; Heinegard, D.; Osteopontin-A possible anchor of osteoclast to bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 4473-4475.

39. Clark, S.A.; Ambrose, W.W.; Anderson, T.R.; Terrell, R.S.; Toverud, S.U.; Ultrastructural localization of tartrate-resistant, purple acid phosphatase in rat osteoclasts by histochemistry and immunocytochemistry. *J. Bone Miner. Res.* **1989**, 4, 399-405.

40. Hayman, A.R.; Cox, T.M.; Purple acid phosphatase of the human macrophage and osteoclast. Characterization, molecular properties and crystallization of the recombinant di-iron-oxo protein secreted by baculovirus –infected insect cells. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 1294-1300.

41. Kaija, H.; Alatalo, S.L.; Halleen, J.M.; Lindqvist, Y.; Schneider, G.; Väänänen, H.K.; Vihko, P.; Phosphatase and oxygen radical-generating activities of mammalian purple acid phosphatase are functionally independent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 292, 128-132.

42. Bozzo, G.G.; Raghothama, K.G.; Plaxton, W.C.; Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 6278-6286.

43. Fatibello-Filho, O.; Capelato, M.D.; Biossensores. *Quim. Nova* **1992**, 15, 28-39.

44. Turner, A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S.; *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press: Oxford, 1988.

45. Carr, P.W.; Bowers, L. D.; *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*, John Wiley: New York, 1980.

46. Guilbault, G.G.; Suleiman, A.A.; Fatibello-Filho, O.; Nabi Rahni, M.A.; *Immobilized Bioelectrochemical Sensors, in Bioinstrumentation and Biosensors*, D. L. Wise, Ed., Marcel Dekker: New York, 1991.

47. Trevan, M.D.; *Immobilized Enzymes: an Introduction and Applications in Biotechnology*, John Wiley & Sons: New York, 1980.

48. Bickerstaff, G.F.; *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press: New Jersey, 1997.

49. Blum, L.J.; Coulet, P. R.; *Biosensor Principles and Applications*, Marcel Dekker: New York, 1991.

50. Vecchia, R.D. Imobilização de lipases em materiais poliméricos: aplicação na síntese de ésteres. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

51. Vecchia, R.D.; Maria, G.N.; Soldi, V.; Aplicação sintética de lipases imobilizadas em polímeros. *Quim. Nova* **2004**, 27, 623-630.

52.Fatibello-Filho, O.; Vieira, I.C.; Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Quím. Nova* **2002**, 25, 455-464.

53.Krajewska, B.; Application of chitin-and-chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, 35, 126-139.

54.Alfaya, A.A.S.; Kubota, L. T.; A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Quim. Nova* **2002**, 25, 835-841.

55.Kennedy, J.F.; White, C.A; Melo, E.H.M.; The immobilization of enzymes and cells. *Chimicooggi* 1988, 21.

56.Kumar, M.N.V.R.; A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* **2000**, 46, 1-27.

57.Guibal, E.; Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Sep. Purif. Technol.* **2004**, 38, 43-74.

58.Justi, K.C.; Laranjeira, M.C.M.; Neves, A.; Mangrich, A.S.; Fávere, V.T.; Chitosan functionalized with 2[-bis-(pyridylmethyl) aminomethyl]4-methyl-6formyl-phenol: equilibrium and kinetics of copper (II) adsorption. *Polymer* **2004**, 45, 6285-6290.

59.Delanoy, G.; Li, Q.; Yu, J.; Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* **2005**, 35, 89-95.

60. Magalhães, J.M.C.S.; Machado, A.A.S.C.; Array of potentiometric sensors for the analysis of creatinine in urine samples. *Analyst* **2002**, 127, 1069-1075.
61. Wang, Y.; Zhu, J.; Zhu, R.; Zhu, Z.; Lai, Z.; Chen, Z.; Chitosan/Prussian blue-based biosensors. *Meas. Sci. Technol.* **2003**, 14, 831-836.
62. Yang, M.; Yang, Y.; Liu, B.; Shen, G.; Yu, R.; Amperometric glucose biosensor based on chitosan with improved selectivity and stability. *Sens. Actuators, B* **2004**, 101, 269-276.
63. Jin, Z.; Su, Y.; Duan, Y.; A novel method for polyaniline synthesis with the immobilized horseradish peroxidase enzyme. *Synthet. Met.* **2001**, 122, 237-242.
64. Bindhu, L.V.; Abraham, E.T.; Immobilization of horseradish peroxidase on chitosan for use in nonaqueous media. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, 88, 1456-1464.
65. Oliveira, I.R.W.Z.; Vieira, I.C.; Lupetti, K.O.; Fatibello-Filho, O.; Fávere, V.T.; Laranjeira, M.C.M.; Biosensor based on chitosan biopolymer and crude extract of ginger (*Zingiber Officinales Rocs.*) for the determination of hidroquinone in wastewater of photographic process. *Anal. Lett.* **2004**, 15, 3111-3127.
66. Wei, X.; Zhang, M.; Gorski, W.; Coupling the lactate oxidase to electrodes by ionotropic gelation of biopolymer. *Anal. Chem.* **2003**, 27, 2060-2064.
67. Ng, L.T.; Yuan, Y.J.; Zhao, H.J.; Natural polymer-based sulfite biosensor. *Electroanalysis* **1998**, 10, 1119-1124.

68.Ng, L.T.; Guthrie, J.T.; Yuan, Y.J.; Zha, H.J.; UV-cured natural polymer-based membrane for biosensor application. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, 79, 466-472.

69.Feng, Jiu-Ju; Zhao, G.; Xu, Jing-Juan; Chen, Hong-Yuan; Direct eletrochemistry and eletrocatalysis of heme proteins immobilized on gold nanoparticles stabilized by chitosan. *Anal. Biochem.* **2005**, 342, 280-286.

70.Luo, X-L; Xu, J-J; Zhang, Q.; Yang, G-J.; Chen, H-Y.; Electrochemically deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through gold nanoparticles self-assembly. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21, 190-196.

71.Peppas, N.A.; *Hydrogels in Medicine and Pharmacy: Fundamentals*, Vol. 1, CRC Press, 1986.

72.Guibal, E.; Dambies, L.; Milot, C.; Influence of polymer structural parameters and experimental conditions on metal anion sorption by chitosan. *Polym. Int.* **1999**, 48, 671-680.

73.Ngah, W.W.; Endual, C.S.; Mayamar, R. Removal of copper (II) ions from aqueous solution into chitosan and cross-linked chitosan beads. *React. Funct. Polym.* **2002**, 50, 181-190.

74.Ngah, W.W.; Ab Ghani, S.; Kamari, A.; Adsorption behavior of Fe (II) and Fe (III) ions aqueous solution on chitosan and cross-linked chitosan beads. *Biores. Tech.* **2005**, 96, 443-450.

75. Yang, Z.; Zhuang, L.; Tan, G.; Preparation and adsorption behavior for metal of chitosan crosslinked by dihydroxy azacrown ether. *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, 85, 530-535.

76. Guibal, E.; Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Sep. Purif. Technol.* **2004**, 38, 43-74.

77. Dini, E.; Alexandridou, S.; Kiparissides, C.; Synthesis and characterization of cross-linked chitosan microspheres for drug delivery applications. *J. Microencapsul.* **2003**, 20, 375-385.

78. Conti, B.; Modena, T.; Genta, I.; Perugini, P.; Pavanetto, F.; A proposed new method for the crosslinking of chitosan microspheres. *Drug Delivery* **1998**, 5, 87-93.

79. Berthold, A.; Cremer, K.; Kreuter, J.; Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs. *J. Controlled Release* **1996**, 39, 17-25.

80. Chithambara, B.; Thanoo, M.; Sunny, M.C.; Jayakrishnan, A; Cross-linked chitosan microspheres: preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals. *Journal of Pharm. Pharmacol.* **1992**, 44, 283-286.

81. Fávere, V.T.; Adsorção de íons Cu (II), Cd (II), Ni (II), Pb (II) e Zn (II) pelo biopolímero quitina, quitosana e pelas quitosanas modificadas. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1994.

82.Mi, F.L.; Kuan, C.Y.; Shyyu, S.S.; The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. *Carbohydr. Polym.* **2000** 41, 389-396.

83.Gonçalves, V.I.; Laranjeira, M.C.M.; Fávere, V.T.; Pedrosa, R.C. Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **2005** 15, 6 -12.

84.Ballantyne, B.; Jordan, S.L; Toxicological, medical and industrial aspects of glutaraldehyde with particular reference to its biocidal use in cold sterilization procedures. *J. Appl. Toxicol.* **2001**, 21, 131-151.

85.Leung, H.W.; Ecotoxicology of glutaraldehyde: Review of environmental fate and effects studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2001**, 49, 26-39.

86.Oliveira, B.F.; Santana, M.H.A.; Ré, M.I.; Spray-dried chitosan microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization. *Proceedings of 14th International Drying Symposium* **2004**, 1, 1166-1173.

87.Kumbar, S.G.; Kulkarni, A.R.; Aminabhavi, T.M.; Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of crosslinking agent. *J. Microencapsul.* **2002**, 19, 173-180.

88.Fatibello-Filho, O.; Lupetti, K. O.; Leite, O.D.; Vieira, I.C.; Electrochemical biosensors based on vegetal tissues and crude extracts for environmental, food and

pharmaceutical analysis. In: Salvador Alegret and Arben Merkoçi. (Edg. Org.). *Electrochemical Sensor Analysis. Part 1-Fundamentals and Applications*. 1 ed. Amsterdam: Elsevier B.V., 2007, v. 1, p. 000-000.

89.Pereira, A.C.; Santos, A.S.; Kubota, L.T.; Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações analíticas. *Quim. Nova* **2002**, 25, 1012, 1021.

90.Rosatto, S.S.; Freire, R.S.; Durán, N.; Kubota, L.T.; Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Quim. Nova* **2001**, 24, 77-86.

91.Adams, R.N.; Carbon paste electrodes. *Anal. Chem.* **1958**, 30, 1576-1576.

92.Gorton, L.; Carbon-paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells. *Electroanalysis* 1995, 7, 23-45.

93.Svancara, I.; Vytras, K.; Barek, J.; Zima, J.; Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2001**, 31, 311-345.

94.Kalcher, K.; Kauffmann, J-M.; Wang, J.; Svancara, I.; Vytras, K.; Neuhold, C.; Yang, Z.; Sensors based on carbon-paste in electrochemical analysis - a review with particular emphasis on the period 1990-1993. *Electroanalysis* **1995**, 7, 5-22.

- 95.Pereira, A.C.; Kubota, L.T.; Otimização da preparação de eletrodo de pasta de carbono contendo riboflavina imobilizada em suporte inorgânico. *Quim. Nova* **2004**, 27, 725-729.
- 96.Lupetti, K.O.; Ramos, L.A.; Vieira, I.C.; Fatibello-Filho, O.; A zucchini-peroxidase biosensor applied to dopamine determination. *Il Farmaco* **2005**, 60, 179-183.
- 97.Oliveira, I.R.W.Z.; Vieira, I.C.; Immobilization procedures for the development of a biosensor for determination of hydroquinone using chitosan an gilo (*Solanum gilo*). *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 38, 449-456.
- 98.Vieira, I.C.; Fatibello-Filho, O.; Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. *Talanta* 2000, 52, 681-689.
- 99.Fatibello-Filho, O.; Lupetti, K.O.; Vieira, I.C.; Chronoamperometric determination of paracetamol using an avocado tissue (*Persea americana*) biosensor. *Talanta* **2001**, 55, 685-689.
- 100.Vieira, I.C.; Lupetti, K.O.; Fatibello-Filho, O.; Sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) tissue as a biocatalyst in a paraffin/graphite biosensor for hydrazine determination in boiler feed water. *Anal. Lett.* **2002**, 35, 2221-2231.
- 101.Leite, O.D.; Lupetti, K.O.; Fatibello-Filho, O.; Vieira, I.C.; Barbosa, A.M.; Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. *Talanta* **2003**, 59, 889-896.

102.Lupetti, K.O.; Vieira, I.C.; Fatibello-Filho, O.; Jack fruit-capric acid biosensor for total phenols determination in wastewaters. *Anal. Lett.* **2004**, 37, 1833-1846.

103.Vieira, I.C.; Fatibello-Filho, O.; Agnes, L.; Zucchini crude extract-palladium-modified carbon paste electrode for the determination of hydroquinone in photographic developers. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 398, 145-151.

104.Oliveira, I.R.W.Z.; Fernandes, S.C.; Vieira, I.C.; Development of biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichorohydrin for determination of rutin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, (in press).

105. Uchiyama, S.; Tamata, M.; Tofuku, Y.; Suzuki, S.; A catecol electrode based on spinach leaves. *Anal. Chim. Acta* **1988**, 208, 291-294.

106.Signori, C.A.; Fatibello-Filho, O.; Biossensor amperométrico para a determinação de fenóis usando extrato de inhame (*Alocasia macrorhiza*). *Quim. Nova*, **1994** 17, 38-42.

107.Caruso, C.S.; Vieira, I.C.; Fatibello-Filho, O.; Determination of epinefrine and dopamine in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of cara root (*Diocorea bulbifera*). *Anal. Lett.* **1999**, 32, 39-50.

108.Leite, O.D.; Fatibello-Filho, O.; Barbosa, A.M.; Determination of catecholamines in pharmaceutical formulations using a biosensor modified with a crude extract of fungi laccase (*Pleurotus ostreatus*). *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 14, 297-303.

109. Fatibello-Filho, O.; Vieira, I.C.; Construction and analytical application of a biosensor based on stearic acid-graphite powder modified with sweet potato tissue in organic solvents. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 368, 338–343.

110. 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* **2003**, 26, 39-43.

111. Ren, C.; Song, Y.; Li, Z.; Zhu, G.; Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized on a silver nanoparticles/cysteamine/gold electrode. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 381, 1179-1185.

112. Yao, H.; Li, N.; Xu, S.; Xu, J-Z.; Zhu, J-J.; Chen, H-Y.; Electrochemical study of a new methylene blue/silicon oxide nanocomposition mediator and its application for stable biosensor of hydrogen peroxide. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21, 372-377.

113. Yuan, R. Liu, Y.; Li, Q-F.; Chai, Y-Q.; Electrochemical characteristics of a platinum electrode modified with a matrix of polyvinyl butyral and colloidal Ag containing immobilized horseradish peroxidase. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 381, 762-768.

114. Di, J.; Shen, S.; Peng, S.; Tu, Y.; Li, S. ; An one-step method to construct a third-generation biosensor based on horseradish peroxidase and gold nanoparticles embed in silica sol-gel network on gold modified electrode. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 553, 196-200.

115.Xu, J-Z.; Zhang, Y.; Li, G-X.; Zhu, J-J.; Electrochemical biosensor constructed by nanosized particles doped sol-gel film. *Mater.Sci. Eng., C* **2004**, 24, 833-836.

116.Liu, Y-L.; Yang, Y-H.; Yang, H-F.; Liu, Z-M.; She, G-L.; Yu, R-Q.; Nanosized flower-like ZnO synthesized by a simple hydrothermal method and an applied as matrix for horseradish peroxidase immobilization for electro-biosensing. *J.Inorg.Biochem.* **2005**, 99, 2046-2053.

117.Yang, H.; Zhu, Y.; A high performance glucose biosensor enhanced via nanosized SiO₂. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 554, 92-97.

118.Toma, H.E.; Interfaces e organização da pesquisa no Brasil: Química e nanotecnologia. *Quim. Nova* **2005**, 28, suplemento, S48-S51.

119.Esteves, A.C.C.; Barros-Timmons, A.; Trindade, T.; Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. *Quim. Nova*, **2004**, 27, 798-806.

120.Herbst, M.H. Macedo, M.I.F.; Rocco, A.M.; Tecnologia dos nanotubos de carbono: Tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. *Quim. Nova*, **2004**, 27, 986-992.

121.Gooding, J.J.; Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing. *Electrochim. Acta* **2005**, 50, 3049-3060.

122.Li, G.; Liao, J.M.; Hu, G.Q.; Ma, N.Z.; Wu, P. J. ; Study of carbon nanotube modified biosensor for monitoring total cholesterol in blood. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 20, 2140-2144.

123.Jia, N.; Liu, L.; Zhou, Q.; Wang, L.; Yan, M.; Jiang, Z.; Bioelectrochemistry and enzymatic activity of glucose oxidase immobilized onto the bamboo-shaped CN_x nanotubes. *Eletrochim. Acta* **2005**, 51, 611-618.

124.Rossi, L.M.; *Novos complexos binucleares de cobre de relevância bioinorganica*. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

125. Neves, A.; Brito, M. A.; Vencato, I.; Drago, V.; Griesar, K.; ; Haase, W.; Fe^{III}Fe^{III} and Fe^{II}Fe^{III} complexes as synthetic analogues for the oxidized and reduced forms of purple acid phosphatases. *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 2360, 2368.

126.Neves, A.; Rossi, L.M.; Bortoluzzi, B.; Wiezbicki, C.; Schwingel, E.; Catecholase activity of a series of dicopper(II) complexes with variable Cu-OH(phenol) moieties. *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 1788-1794.

127.Karsten, P.; Neves, A.; Bortoluzzi, A. J.; Strahle, J.; Maichele-Mossmer, C.; Synthesis, structure and catalase-like activity of a new dinuclear mixed valence Mn^{II}Mn^{III} complex containing an asymmetric N₅O₂ donor ligand. *Inorg. Chem. Commun.* **2002**, 5, 434-438.

128. Neves, A.; Rossi, L.M.; Horn, A.; Vencato, I.; Bortoluzzi, A. J.; Zucco, C.; Mangrich, A.S.; Synthesis, structure and properties of the first dinuclear copper (II) complex as a structural model for the phenolic intermediate in tyrosinase-cresolase activity. *Inorg. Chem. Commun.* **1999**, 2, 334-337.
129. Sotomayor, M.D.P.; Kubota, L.T.; Enzymeless Biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. *Quim. Nova* **2002**, 25, 123-128.
130. Lotzbeyer, T.; Schuhmann, W.; Schmidt, H-L; Electron transfer principles amperometric biosensors: direct electron transfer between enzymes and electrode surface. *Sens. Actuators B* **1996**, 33, 50-54.
131. Lotzbeyer, T.; Schuhmann, W.; Schmidt, H-L; Minizymes. A new strategy for the development of reagentless amperometric biosensors based on direct electron transfer processes. *Bioelect. Bioenerg.* **1997**, 42, 1-6.
132. Sotomayor, M.D.P.; Tanaka, A.A.; Kubota, L.T.; Development of an amperometric sensor for phenol compounds using a Nafion membrane doped with copper dipyriddy complex as a biomimetic catalyst. *J. Eletroanal. Chem.* **2002**, 536, 71-81.
133. Sotomayor, M.D.P.; Tanaka, A.A.; Kubota, L. T.; Tris (2,2' – bipyridil) copper (II) choride complex: a biomimetic tyrosinase catalyst in the amperometric sensor construction. *Eletrochim. Acta* **2003**, 48, 855-865.

134. Hasebe, Y.; Akiyama T.; Yagisawa T.; Uchiyama, S.; Enzyme-less amperometric biosensor for L-ascorbate using poly-histidine-copper complex as an alternative biocatalyst. *Talanta* **1998**, 47, 1139-1147.
135. Berchmans, S.; Gomathi, H.; Rao, G.P.; Enzymeless approach for the determination of some biologically important species. *Sens. Actuators B chem.* **1998**, 50, 156-163.
136. Lee, B.L.; Ong, H.Y.; Shi, C.Y.; Ong, C.N.; Simultaneous determination of hydroquinone, catechol and phenol in urine using high-performance liquid-chromatography with fluorometric detection. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **1993**, 619, 259-266.
137. Corominas, B.G.T.; Icardo, M.C.; Zamora, L.L.; Mateo, J.V.G.; Martínez-Calatayud, J.; A tandem-flow assembly for the chemiluminometric determination of hydroquinone. *Talanta* **2004**, 64, 618-625.
138. Sakodinskaya, I.K.; Desiderio, C.; Nardi, A.; Fanali, S.; Micellar electrokinetic chromatographic study of hydroquinone and some its ethers determination of hydroquinone in skin-toning cream. *J. Cromatogr.* **1992**, 596, 95-100.
139. Firth, J.; Rix, I.; Determination of hydroquinone in skin-toning creams using high-performace liquid-chromatography. *Analyst* **1986**, 111, 129-132.
140. Jia, L.P.; Zhang, A.M.; Catalytic spectrophotometric determination of trace hydroquinone. *Chinese. J. Anal. Chem.* **2003** 31, 1508-1510.

141. Gajewska, T.; Kaszuba, A.; The UV spectrophotometric determination of migrated hydroquinone. *Polymer* **1999**, 44, 690-696.
142. Wang, L.H; Simultaneous determination of hydroquinone ethers in cosmetics after preconcentration at a carbon-paste electrode. *Analyst* **1995**, 120, 2241-2244.
143. Harborne J.B.; Williams, C.A.; Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **2000** 55, 481-504.
144. Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A.A.; Capasso, F.; Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutics drugs. *Life Sci.* **1999**, 65, 337-353.
145. Calabrò, M.L.; Tommasini, S.; Donato, P.; Stancanelli, R.; Raneri, D.; Catania, S.; Costa, C.; Villari, V.; Ficarra, P.; Ficarra, R.; The rutin/ β -cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 36, 1019-1027.
146. Hasumura, M.; yasuhara, K.; Tamura, T.; Imai, T.; Mitsumori, K.; Hirose, M.; Evaluation of the toxicity of enzymatically decomposed rutin with 13-weeks dietary administration to Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, 42, 439-444.
147. Wang, Q.; Ding, F.; Li, H.; He, P.; Fang, Y.; Determination of hydrochlorothiazide and rutin in Chinese herb medicines and human urine by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 30, 1507-1514.

147. Blasco, A.J., Gonzalez, M.C. and Escarpa, A., Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 511, 71-81.

148. Hassan, H.N.A.; Barsoum, B.N.; Habib, I.H.I.; Simultaneous spectrophotometric determination of rutin, quercetin and ascorbic acid in drugs using a Kalman Filter approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 20, 315-320.

149. Lavanya, K.; Baggi, T.R.; Spectrophotometric determination of rutin in pharmaceutical preparation using 3-methylbenzthiazolinone-2-hydrazone. *Microchem. J.* **1990**, 41, 126-131.

150. Sakamoto, M.; Takamura, K.; Consecutive determination of rutin and quercetin by spectrophotometric measurements. *Microchem. J.* **1978**, 23, 374-383.

151. Sun, Y.; Guo, T.; Sui, Y.; Li, F.M.; Quantitative determination of rutin, quercetin, and adenosine in flos carthami by capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.* **2003**, 26, 1203-1206.

152. Chen, G.; Zhang, H.W.; Ye, J.N.; Determination of rutin and quercetin in plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta* **2000**, 423, 69-76.

153. Kang, J.W.; Lu, X.Q.; Zeng, H.J.; Liu, H.D.; Lu, B.Q.; Investigation on the electrochemistry of rutin and its analytical application. *Anal. Lett.* **2002**, 35, 677-686.

154. Jarosz-Wilkolazka, A.; Ruzgas, T.; Gorton L.; Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, 35, 238-241.

155. Blasco, A.J.; González, M.C.; Escarpa, A.; Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 511, 71-81.

156. Yoshitake, T.; Yoshitake, V.; Nohta, H.; Yamaguchi, V.; Kehr, J.; High-sensitive liquid chromatographic method for determination of neuronal release of serotonin, noradrenaline and dopamine monitored by microdialysis in the rat prefrontal cortex, *J. Neurosc. Meth.* **2004**, 140, 163-168.

157. Sabbioni, C.; Saracino, M.A.; Mandrioli, R.; Pinzauti, S.; Furlanetto, S.; Gerra, G.; Raggi, M.A.; Simultaneous liquid chromatographic analysis of catecholamines and 4-hydroxy-3-methoxyphenylethylene glycol in human plasma - Comparison of amperometric and coulometric detection. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1032, 65-71.

158. Maminski, M.; Olejniczak, M.; Chudy, M.; Dybko, A.; Brzózka, Z.; Spectrophotometric determination of dopamine in microliter scale using microfluidic system based on polymeric technology. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 540, 154-157.

159. Nagaraja, P.; Vasantha, K.R.; Sunitha. A sensitive and selective spectrophotometric estimation of catechol derivatives in pharmaceutical preparations. *Talanta* **2001**, 55, 1039-1046.

160. Volikakis, G.J.; Efstathiou, C.E.; Determination of rutin and other flavonoids by flow-injection:adsorptive stripping voltammetry using nujol-graphite and diphenylether-graphite paste electrodes. *Talanta* **2000**, 51, 775-785.
- 161.Zhang, P.; Wu, F-H.; Zhao, G-C.; Wei, X-W.; Selective response of dopamine in the presence of ascorbic acid at multi-walled carbon nanotube modified gold electrode. *Bioelectrochemistry* **2005**, 67, 109-114.
162. Sun, D.; Ma, W.; Zhang, Z.; Cyclic voltammetric determination of dopamine in drug using poly (L-lysine) modified electrode. Chinese. *J. Anal. Chem.* **2006**, 34, 668-670.
- 163.Farmacopéia Brasileira, 3a ed., Org. Andrei Editora AS, São Paulo, 1977, p.524.
164. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., 1995, p. 471, 29.
- 165.Vieira, I.C.; Desenvolvimento e aplicação de métodos enzimáticos para determinação de fenóis, sulfito e catecolaminas usando extrato bruto de batata doce (*Ipomoea batatas (L.) Lam.*). Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1997.
166. Jeffery, G.H.; Basset, J.; Mendham, J.; Denney, R.C.; Vogel – Análise Química Qualitativa, 5ª edição, LTC – Livros técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 1992, p.322.
- 167.Bergemeyer, J.; Grabl, M.; Methods of enzymatic analysis, Vol. 2, VCH Verlagsgesellschaft, New York, 1988, p.267.

168. Gornall, A.G.; Bardawill, C. J.; David, M.M.; Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **1949**, 177, 751-766.

169. Broussignac, J.; Un Hault polymere naturel per connum dans l'industri lê chitosan, *Chimie et Industrie-Genie Chimique* **1972**, 99, 1241.

170. Osório, R.E.M.B.; Desenvolvimento de um novo ligante e complexo binuclear de cobre(II) de relevância bioinorgânica: Modelo para catecol oxidase. Trabalho de conclusão de Curso - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

171. Oliveira, I.R.W.Z.; Osorio, R.H.M.B.; Neves, A.; Vieira, I.C. Biomimetic sensor based on a novel copper complex for the determination of hydroquinone in cosmetics. *Sens. Actuators B* **2006**, (In press).

172. Horn-Junior, A.; Síntese e caracterização de novos complexos de ferro com ligantes não simétricos N,O-doadores como modelos para o sítio ativo das fosfatases ácidas púrpuras. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

173. Neves, A.; Brito, M.A.; Drago, V.; Griesa, K.; Haase, W.; A new asymmetric N^5O^2 -donor binucleating ligand and its first $Fe^{II}Fe^{III}$ complex as a model for the redox properties of uteroferrin. *Inorg. Chim Acta* **1995**, 237, 131-135.

174.Ruzgas, T.; Csöregi, E.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Vargo, G.; Peroxidase-modified electrodes: fundamentals and application. *Anal. Chim. Acta* **1996**, 330, 123-138.

175.Regalado, C.; Garcia-Almendárez, B.E.; Duarte-Vázquez, M.A.; Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem. Rev.* **2004**, 3, 243-256.

176.Fatibello-Filho, O.; Vieira, I.C.; Flow injection spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using a crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*) as a source of peroxidase. *Analyst* **1998**, 123, 1809-1812.

177.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.* **2006**, (in press).

178.Roberts, G.A.F.; Chitin Chemistry, The Macmillan Press: New York, 1992.

179.Brugnerotto, J.; Lizardi, J.; Goycoolea, F.M.; Argüelles-Monal, W.; Desbrières, J.; Rinaudo, M.; An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* **2001**, 42, 3569-3580.

180.Spinelli, V.A.; Estudos de adsorção dos oxiânions metálicos Cr (VI), Mo (VI) e Se(VI) pelo sal amônio quaternário de quitosana. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2005.

181.Xi, F.; Wu, J.; Jia, Z.; Lin, X.; Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead. *Proc. Biochem.* **2005**, 40, 2833-2840.

182.Cestari, A.R.; Airoldi, C; Diamine immobilization on silica gel through sol-gel process and the increase in organic chain by using glutaraldehyde followed by ethylenediamine, *Langmuir*, **1997**,13, 2681-2686.

183.Hsien, T.Y.; Rorrer, G.L.; Effects of acylation and crosslinking on the material properties and cadmium ion adsorption capacity of porous beads, *Sep. Sci. Technol.* **1995**, 30, 2455-2475.

184.Roberts, G.A.F.; Taylor, K.E.; The formation of gels by reaction of chitosan with glutaraldehyde, *Macromol. Chem.* **1996**, 190, 951-960.

185. Handbook of Enzyme Biotechnology, second edition, (Ed) Alan Wiseman, John Wiley & Scws, 1985.

186.Chiou, S.H.; Wu, W.T.; Immobilization of candida rugosa lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, **2004**, 25, 197-204.

187.Whitaker, J.R.; Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Dekker. INC. New York and Basel, 1972, p.545.

188. Jazdzewski, B.A.; Tolman, W.B.; Understanding the copper-phenoxy radical array in galactose oxidase: contributions from synthetic modeling studies. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 202, 633-685.

189. Anjos, A.; Novos complexos metalo-radicalares de relevância bioinorgânica: 1) modelos biomiméticos para enzima galactose oxidase, 2) modelos complexos metalo fenoxil. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2005.

190. Lloyd, R.V.; Hanna, P.M.; Mason R.P.; The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radical Bio. Med.* **1997**, 885-888.

191. Guddat, L.W.; McAlpine, A.S.; Hume, D.; Hamilton, S.; Jersey, J.J.; Martin, J.L.; Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. *Structure* **1999**, 7, 757-767.

192. Kurtz, D.M.; Avoiding high-valent iron intermediates: Superoxide reductase and rubrerythrin. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 100, 679-693.

193. Gani, D.; Wilkie, J.; Metal ions in the mechanism of enzyme-catalysed phosphate monoester hydrolyses. In. *Structure and Bonding*. Berlin: Springer-Verlag, 1997, 89, 133-175.