



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SUELLEN CADORIN FERNANDES

**BIOSENSOR PARA ÁCIDO CLOROGÊNICO
CONTENDO LÍQUIDO IÔNICO COM
NANOPARTÍCULAS DE IRÍDIO**

Florianópolis - SC

2009

SUELLEN CADORIN FERNANDES

**BIOSSENSOR PARA ÁCIDO CLOROGÊNICO
CONTENDO LÍQUIDO IÔNICO COM
NANOPARTÍCULAS DE IRÍDIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química como requisito à obtenção do título de mestre em química.

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

Florianópolis – SC

2009

Suellen Cadorin Fernandes

**BIOSENSOR PARA ÁCIDO CLOROGÊNICO CONTENDO
LÍQUIDO IÔNICO COM NANOPARTÍCULAS DE IRÍDIO**

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

Florianópolis, 19 de Fevereiro de 2009.

Prof. Dr. Ademir Neves

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Almir Spinelli

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Prof. Dr. Hernán Francisco Terenzi

***Aos meus pais,
Lauro e Matilde.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde e perseverança;

À minha família, que tornaram possível a chegada até aqui;

À Prof^a Dr^a Iolanda da Cruz Vieira pelo apoio, incentivo, paciência e por participar ativamente dessa jornada;

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina por permitir viver esta experiência;

A CAPES pelo suporte financeiro deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Jairton Dupont, pela doação do líquido iônico;

Ao Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke e a mestrandia Melina Heller, pelo método comparativo de eletroforese capilar;

Aos professores e funcionários do Departamento de Química que de alguma forma contribuíram para minha formação;

Ao meu amor Luciano, essencial em minha vida;

Aos amigos do Laboratório LaBios pela amizade, ajuda e descontração;

Aos amigos que tive o prazer de conhecer durante a minha graduação e que irei levar eternamente em meu coração, em especial as minhas Divas Larissa, Maria Alice e Paula.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| Lista de Figuras | VIII |
| Lista de Tabelas | XI |
| Lista de Abreviaturas | XII |
| Resumo | XIII |
| Abstract | XIV |
| | |
| 1. Introdução | |
| 1.1. Biossensor | 01 |
| 1.2. Enzimas | 06 |
| 1.3. Cinética enzimática | 12 |
| 1.4. Polifenol oxidase | 14 |
| 1.5. Imobilização de enzimas | 17 |
| 1.6. Quitosana | 20 |
| 1.7. Líquido iônico | 23 |
| 1.8. Ácido clorogênico | 26 |
| | |
| 2. Objetivos | |
| 2.1. Objetivo geral | 29 |
| 2.2. Objetivo específico | 29 |
| | |
| 3. Procedimento Experimental | |
| 3.1. Reagentes e soluções | 31 |
| 3.2. Instrumentação | 32 |
| 3.3. Metodologia | 34 |
| 3.3.1. Obtenção do extrato bruto enzimático | 34 |
| 3.3.2. Determinação da atividade enzimática da polifenol oxidase | 35 |
| 3.3.3. Reticulação da quitosana | 35 |
| 3.3.4. Imobilização da enzima no suporte quitosana | 36 |
| 3.3.5. Construção do eletrodo | 36 |

| | |
|---|----|
| 3.3.6. Medidas eletroquímicas | 37 |
| 3.3.7. Preparo das amostras | 37 |
| 4. Resultados e Discussão | |
| 4.1. Estudo da atividade enzimática | 38 |
| 4.2. Reticulação da quitosana e imobilização da polifenol oxidase | 39 |
| 4.3. Morfologias das pastas de carbono | 41 |
| 4.4. Contribuição do líquido iônico | 43 |
| 4.5. Reação enzimática | 44 |
| 4.6. Otimização e desempenho do biossensor | 45 |
| 4.6.1. Porcentagem de líquido iônico | 46 |
| 4.6.2. Concentração de enzima | 47 |
| 4.6.3. Efeito do pH | 48 |
| 4.6.4. Frequência | 50 |
| 4.6.5. Amplitude de Pulso | 51 |
| 4.6.6. Incremento | 52 |
| 4.7. Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica | 53 |
| 4.8. Repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade | 56 |
| 4.9. Estudo de recuperação | 57 |
| 4.10. Determinação de ácido clorogênico em café | 58 |
| 5. Conclusões | 60 |
| 6. Referências | 62 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1. | Princípio de operação de um biossensor | 03 |
| Figura 2. | Representação comparativa da energia de ativação de uma reação não enzimática e uma reação enzimática..... | 06 |
| Figura 3. | Estrutura primária, secundária, terciária e quaternária de uma enzima | 09 |
| Figura 4. | Molécula de enzima polifenol oxidase e seu sítio ativo..... | 10 |
| Figura 5. | Modelo (a) chave-fechadura e (b) encaixe induzido..... | 11 |
| Figura 6. | Concentração de substrato <i>versus</i> velocidade da reação enzimática. | 13 |
| Figura 7. | Estrutura tridimensional da polifenol oxidase | 15 |
| Figura 8. | Técnicas de imobilização de enzimas..... | 20 |
| Figura 9. | Estruturas químicas das unidades (A) $\beta(1,4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e (B) $\beta(1,4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose | 21 |
| Figura 10. | Estrutura química da quitosana | 22 |
| Figura 11. | Estrutura química do ácido clorogênico..... | 27 |
| Figura 12. | Representação da célula eletroquímica contendo eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar | 33 |

| | |
|--|----|
| Figura 13. Determinação da atividade enzimática da polifenol oxidase | 38 |
| Figura 14. Imobilização da enzima em quitosana ionicamente reticulada com oxalato | 41 |
| Figura 15. MEV da pasta de carbono contendo (A) nujol e (B) Ir-BMI.PF ₆ | 42 |
| Figura 16. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando (a) eletrodo de pasta de carbono contendo nujol, (b) eletrodo de pasta de carbono contendo BMI.PF ₆ , (c) eletrodo de pasta de carbono contendo Ir-BMI.PF ₆ e (d) eletrodo de pasta de carbono contendo Ir-BMI.PF ₆ -PFO em solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ e frequência de 100,0 Hz, amplitude de pulso de 100,0 mV e incremento de 5,0 mV..... | 44 |
| Figura 17. Representação esquemática da oxidação/redução do ácido clorogênico na superfície do biossensor | 45 |
| Figura 18. Estudo da porcentagem de líquido iônico no biossensor utilizando solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,0) | 47 |
| Figura 19. Estudo da concentração de enzima no biossensor utilizando solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,0) | 48 |

- Figura 20.** Efeito do pH sobre a resposta do biossensor utilizando solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ 49
- Figura 21.** Estudo da frequência sobre a resposta analítica do biossensor utilizando solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0) 50
- Figura 22.** Estudo da amplitude de pulso sobre a resposta analítica do biossensor utilizando solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0) 51
- Figura 23.** Estudo do incremento sobre a resposta analítica do biossensor utilizando solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0) 52
- Figura 24.** Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica obtida usando o biossensor proposto em (a) solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 6,0) e com adição de ácido clorogênico: (b) $3,48 \times 10^{-6}$; (c) $4,95 \times 10^{-6}$; (d) $1,46 \times 10^{-5}$; (e) $2,38 \times 10^{-5}$; (f) $3,27 \times 10^{-5}$; (g) $4,13 \times 10^{-5}$ e (h) $4,95 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em frequência de 30 Hz, amplitude de pulso de 100 mV e incremento de 1,0 mV 56

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Otimização dos parâmetros experimentais | 53 |
| Tabela 2. Estudo de recuperação de ácido clorogênico em café orgânico (A, B) e descafeinado (C, D) | 58 |
| Tabela 3. Determinação de ácido clorogênico (g L^{-1}) em amostras de café orgânico (A, B) e descafeinado (C, D) | 59 |

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs - Absorbância

BMI.PF₆ - Hexafluorofosfato de 1-n-butil-3-metilimidazol

D.E. - Diâmetro externo

D.I. - Diâmetro interno

E - Enzima

Er - Erro relativo

ES - Complexo enzima-substrato

His - Histidina

Ir-BMI.PF₆ - Hexafluorofosfato de 1-n-butil-3-metilimidazol contendo nanopartículas de irídio

KM - Constante de Michaelis-Menten

LI - Líquido iônico

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

PFO - Polifenol oxidase

QTS - Quitosana

S - Substrato

t - Tempo

V - Velocidade de reação

V_m - Velocidade máxima

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um biossensor utilizando o líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazol contendo nanopartículas de irídio disperso (Ir-BMI.PF₆) juntamente com a enzima polifenol oxidase obtida da fruta do conde (*Annona squamosa*). Esta enzima foi imobilizada em quitosana ionicamente reticulada com oxalato e o biossensor foi utilizado na determinação de ácido clorogênico em amostras de café orgânico e descafeinado. A polifenol oxidase catalisa a oxidação do ácido clorogênico a sua respectiva quinona, cuja redução eletroquímica ocorre em potencial de +0,25 V (*versus* Ag/AgCl). As melhores condições experimentais do biossensor foram obtidas utilizando tampão fosfato pH 6,0, 1200 unidades mL⁻¹ de enzima, frequência de 30 Hz, amplitude de pulso de 100 mV e incremento de 1,0 mV. A curva analítica foi construída a partir da corrente resultante *versus* concentração de ácido clorogênico respondendo linearmente em um intervalo de $3,48 \times 10^{-6}$ a $4,95 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, apresentando um limite de detecção de $9,15 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. A recuperação do ácido clorogênico nas amostras de café variou de 93,2 a 105,7% e a determinação desta substância usando o biossensor está em concordância com o método de eletroforese capilar.

Palavras-Chaves: Biossensor, nanopartículas de irídio, líquido iônico, polifenol oxidase.

ABSTRACT

In this work, a biosensor using 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate with iridium nanoparticles dispersed (Ir-BMI.PF6) together with the enzyme polyphenol oxidase obtained from the custard apple (*Annona squamosa*) was developed. This enzyme was immobilized on chitosan ionically crosslinked with oxalate and the biosensor was used in the determination of chlorogenic acid in organic and decaffeinated coffee samples. The polyphenol oxidase catalyzes the oxidation of chlorogenic acid to its corresponding quinone, which the electrochemical reduction occurred at a potential of +0.25 V (versus Ag/AgCl). The best experimental conditions of the biosensor were obtained using phosphate buffer pH 6.0, 1200 units mL⁻¹ enzyme, frequency of 30 Hz, pulse amplitude of 100 mV and pulse increase of 1.0 mV. The analytical curve was built from the resulting current versus concentration of chlorogenic acid responding linearly in a range of 3.48×10^{-6} to 4.95×10^{-5} mol L⁻¹, with a detection limit of 9.15×10^{-7} mol L⁻¹. The recovery of chlorogenic acid in coffee samples ranged from 93.2 to 105.7% and the determination of this substance using the biosensor is in line with capillary electrophoresis method.

Keywords: Biosensor, iridium nanoparticles, ionic liquid, polyphenol oxidase.

1. INTRODUÇÃO

1.1. BIOSSENSOR

Clark & Lyons, em 1962, construíram o primeiro sensor amperométrico à glicose utilizando glicose oxidase fisicamente imobilizada em uma membrana de celulose acoplada a um eletrodo de oxigênio (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; COSNIER, 1999). Desde então, o desenvolvimento de dispositivos eletroanalíticos vem sendo projetado e empregado na análise química de várias substâncias nas mais diversas áreas, tais como clínica, ambiental, biotecnologia e agricultura (MELLO e KUBOTA, 2002).

O primeiro biossensor contendo tecido vegetal foi desenvolvido por Kuriyama & Rechnitz em 1981 para a determinação de L-glutamato. Este biossensor foi construído colocando-se uma fatia de tecido de abóbora (*yellow squash*), fonte da enzima L-glutamato descarboxilase (EC: 4.1.1.15) em um eletrodo de CO₂. Essa enzima catalisa a reação de oxidação do glutamato (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002), como mostrada na Equação 1.



Os biossensores contendo tecidos de vegetais oferecem alta estabilidade, atividade catalítica e tempo de vida, além do baixo custo

quando comparados aos biossensores construídos com enzimas puras. Estas características resultam do ambiente natural onde as enzimas são encontradas (MELLO e KUBOTA, 2002). Porém, a baixa seletividade devido à presença de outras enzimas no tecido vegetal e o longo tempo de resposta ocasionado pela espessura do tecido compromete a utilização desse sistema. Desse modo, alternativamente pode ser utilizado pó do tecido desidratado ou extrato bruto do vegetal para construção de biossensores (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002; CAMPÀS et al., 2008).

Signori & Fatibello-Filho foram os pioneiros no desenvolvimento de um biossensor utilizando extrato bruto (homogenato) de vegetal. O biossensor foi construído empregando extrato de inhame (*Alocasia macrorhiza*) como fonte da enzima polifenol oxidase imobilizado com glutaraldeído na superfície de um eletrodo de oxigênio e usado na determinação amperométrica de compostos fenólicos em águas residuárias (FATIBELLO-FILHO e VIERA, 2002).

O grande potencial de aplicações tecnológicas dos biossensores tem impulsionado o crescimento de publicações nesta área, principalmente nos últimos anos com o desenvolvimento de novos dispositivos, bem como novas técnicas de imobilização do material biológico (TELES e FONSECA, 2008).

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo composto por um material biológico (enzimas, anticorpos, antígenos, entre outros) conectado a um transdutor que converte o sinal biológico em um sinal apropriado, proporcional à concentração do analito. O princípio da

detecção é o vínculo específico do analito de interesse com o material biológico de reconhecimento immobilizado em um suporte adequado. Esta interação resulta em uma mudança nas propriedades físico-químicas (variação de pH e de massa, transferência de elétrons, transferência de calor, etc) que é detectada e medida pelo transdutor (VELASCO-GARCIA e MOTTRAM, 2003).

Qualquer variável que esteja relacionada com a reação de reconhecimento poderá ser usada para gerar um sinal. Dentre os transdutores utilizados destacam-se os amperométricos, potenciométricos, ópticos, piezoelétricos e calorimétricos (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO 1992; MELLO e KUBOTA, 2007). Os componentes que formam um biossensor estão ilustrados na Figura 1.

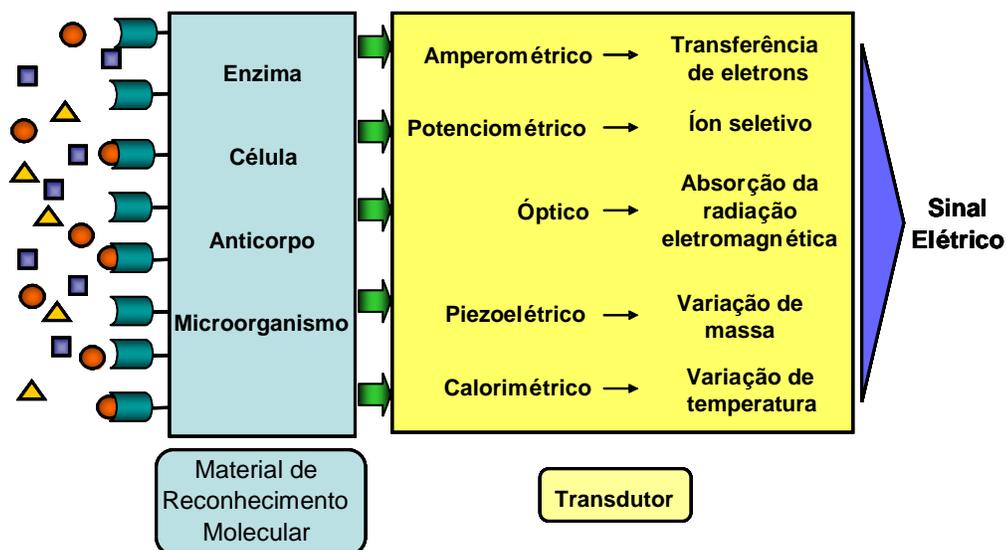


Figura 1: Princípio de operação de um biossensor

(<http://www.jaist.ac.jp/~yokoyama/biosensor.html>).

No transdutor amperométrico a medida de intensidade de corrente, utilizando um potencial fixo, gera uma corrente proporcional à concentração da espécie na superfície do eletrodo. O sistema normalmente é constituído por três eletrodos: um eletrodo de trabalho para monitorar a resposta do analito, um eletrodo de referência que regula o potencial aplicado no eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar que fornece a corrente ao primeiro (D`ORAZIO, 2003; RICCARDI et al., 2002).

O transdutor potenciométrico envolve um eletrodo íon seletivo que produz um sinal elétrico obtido pela sensibilidade da mudança no potencial que resulta da acumulação de íons na membrana do eletrodo de trabalho. Transdutores potenciométricos são utilizados em inúmeras aplicações comerciais, sendo o eletrodo de vidro o mais conhecido (LEI et al., 2006).

O transdutor óptico está baseado na reação entre a enzima e o analito que irá oxidar um cromóforo provocando uma mudança na absorção da radiação eletromagnética. A absorbância do composto formado é proporcional à concentração do analito a ser determinado. As principais vantagens desse transdutor envolvem a rapidez e a reprodutibilidade das medidas, enquanto a principal desvantagem se dá pelo alto custo do aparelho utilizado (FARRÉ et al., 2008).

O transdutor piezoelétrico consiste na utilização do fenômeno de deformação mecânica da superfície de alguns cristais (quartzo, turmalina, etc) onde uma diferença de potencial elétrico é produzida proporcionalmente a pressão aplicada. Quando o cristal piezoelétrico é

colocado em um campo elétrico oscilante ocorre o efeito inverso provocando distorções físicas no cristal. Nos biossensores, a mudança de massa ou a viscosidade da solução, devido à interação entre a superfície do transdutor modificado e das espécies detectáveis, podem ser determinadas (JIA et al., 2008; BIZET et al., 1999).

Os transdutores calorimétricos baseiam-se na medida da variação de temperatura produzida por uma reação enzimática utilizando um termistor que obterá uma resposta linear da temperatura em função da concentração do analito, baseando-se em variações de sua resistência (FARRÉ et al., 2008).

Os biossensores são ferramentas promissoras para auxiliar técnicas já existentes, devido as suas características intrínsecas como seletividade, elevada sensibilidade, reprodutibilidade, custo moderado, potencial para miniaturização/automação, redução de procedimentos de pré-tratamento da amostra e construção de dispositivos simples para rápido monitoramento contínuo (GOMES e REBELO, 2003; FREIRE et al., 2002). As desvantagens das medições eletroquímicas, comparadas às efetuadas com técnicas espectroscópicas, refere-se à menor abrangência de compostos possíveis para determinação (MELLO e KUBOTA, 2007; FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992).

As enzimas são altamente específicas e esta importante característica favorece o crescimento de seu uso na construção de novos biossensores. Um biossensor desejável e de bom funcionamento deve oferecer elevado nível de seletividade, boa estabilidade nas condições de

operação (temperatura, pH, etc) e também nas condições de armazenamento, mantendo a atividade biológica por um longo período de tempo e possuir boa reprodutibilidade (PATACAS, 2007).

1.2. ENZIMAS

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Elas atuam no sentido de aumentar a velocidade da reação e diminuir a energia de ativação para que esta reação química seja termodinamicamente favorável sem a modificação do equilíbrio químico (BERG et al., 2002; VOET e VOET, 1995), como mostrada na Figura 2.

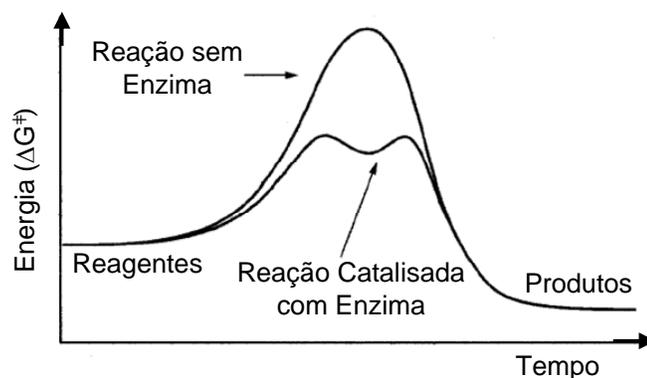


Figura 2: Representação comparativa da energia de ativação de uma reação não enzimática e uma reação enzimática.

As enzimas são classificadas em seis grandes grupos de acordo com o tipo de reações que catalisam. Tal divisão foi proposta pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>).

1. Oxidorrredutases: Realizam reações de óxido-redução em sistemas biológicos, incluindo nesta classe as hidrogenases, oxidases, peroxidases, hidroxilases e as oxigenases.
2. Transferases: Catalisam a transferência de grupos de um composto para o outro.
3. Hidrolases: Envolve reações de hidrólise de ligações covalentes.
4. Liases: Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico.
5. Isomerases: Catalisam reações de isomerismos ópticos e geométricos.
6. Ligases: Realizam a união de duas moléculas associadas à ruptura da ligação do ATP.

As enzimas são caracterizadas pela quantidade de aminoácidos presentes em sua estrutura e a ordem em que se encontram. A estrutura primária é a seqüência de aminoácidos que forma a cadeia polipeptídica. A estrutura secundária compreende as distorções angulares da cadeia protéica devido às interações intermoleculares formadas através de

pontes de hidrogênio fazendo com que a proteína assumira uma forma de α -hélice ou β -folha. A conformação espacial da proteína como um todo forma sua estrutura terciária, que é composta por dobras e enrolamentos provocados pelas interações hidrofóbicas entre os grupos dos aminoácidos e a água. Refere-se à estrutura quaternária quando há mais de uma subunidade da estrutura terciária interagindo entre si formando complexos tridimensionais de uma ou mais cadeias polipeptídicas (GUILBAULT, 1984; BERG et al., 2002; VOET e VOET, 1995). A Figura 3 apresenta as quatro estruturas de formação das enzimas.

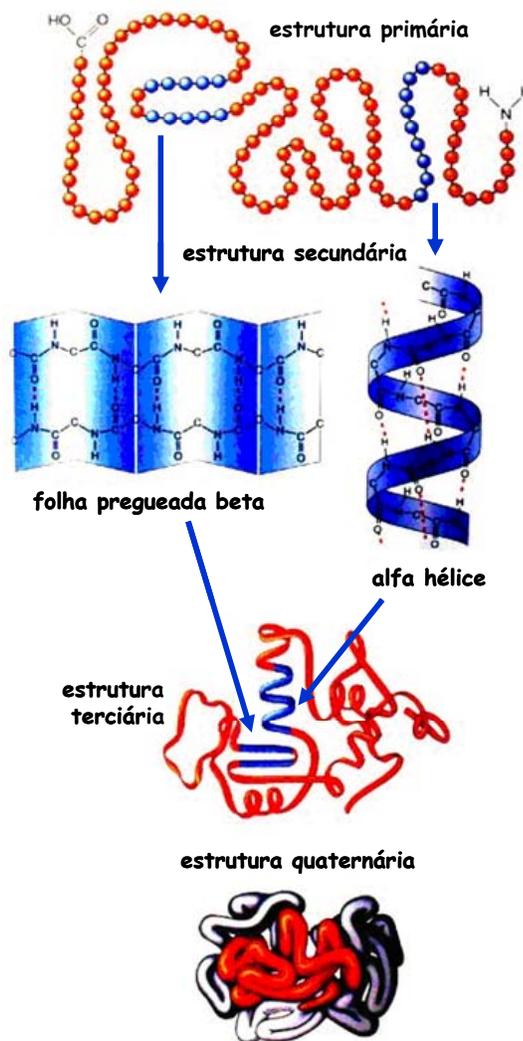


Figura 3: Estrutura primária, secundária, terciária e quaternária de uma enzima (<http://www.simbiotica.org/composicaoquimicacelula.htm>).

A atividade catalítica, bem como sua estabilidade e especificidade depende da sua estrutura tridimensional. Condições ambientais tais como pH, temperatura e força iônica do meio afetam a estrutura da enzima e, em decorrência, suas propriedades. No sítio ativo da enzima, onde ocorre o processo de catálise, encontram-se resíduos de aminoácidos que participam diretamente na quebra e/ou formação de ligações. Algumas

enzimas necessitam de íons metálicos ou moléculas orgânicas complexas denominadas coenzimas para realizar a atividade catalítica. A apoenzima seria a parte protéica de uma enzima desprovida dessas moléculas. A molécula toda (coenzima e apoenzima) recebe o nome de holoenzima (GUILBAULT, 1984; BERG et al., 2002; VOET e VOET, 1995; MIKKELSEN e CORTÓN, 2004).

A alta especificidade da enzima deve-se a acomodação do substrato no sítio ativo que interage com os grupos químicos da cadeia lateral dos aminoácidos presentes. Todo tratamento que modifique a conformação da enzima modificando a estrutura do sítio ativo, alterará as propriedades catalíticas da enzima e, portanto, o seu funcionamento (LIMA et al., 2001). A Figura 4 ilustra uma molécula da enzima polifenol oxidase e seu sítio ativo.

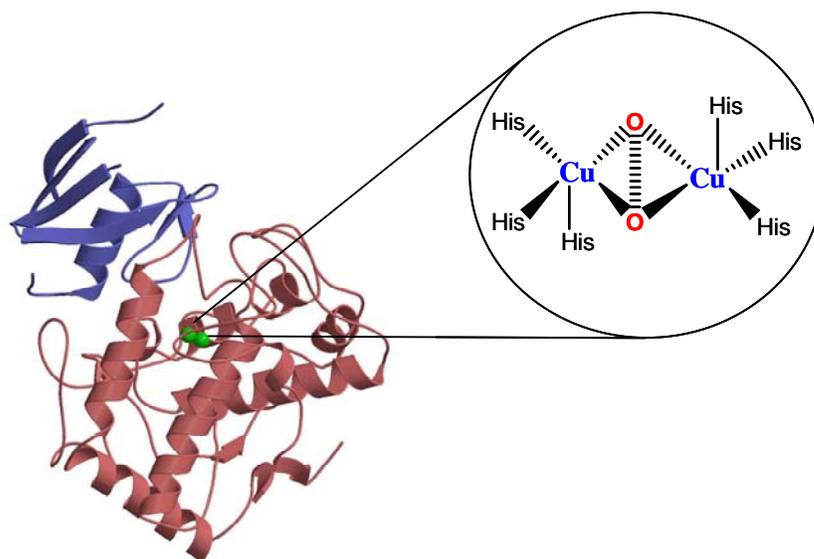


Figura 4: Molécula da enzima polifenol oxidase e seu sítio ativo

(DURÁN et al.,2002).

Em 1894, Hermann Emil Fischer propôs um modelo para explicar a especificidade enzimática que é comparada a um modelo chave-fechadura. Neste modelo, prevê-se o encaixe perfeito do substrato - a chave, de maneira precisa no sítio ativo da enzima, que seria rígido como uma fechadura (Figura 5a). No entanto, Daniel E. Koshland Jr. em 1958 sugeriu o modelo do ajuste induzido (Figura 5b): o sítio ativo de algumas enzimas assume estruturas flexíveis moldando-se à molécula do substrato durante o estado de transição e como resultado, o substrato não se liga simplesmente a um sítio ativo rígido. As cadeias laterais dos aminoácidos que formam o sítio ativo sofrem uma reorientação de maneira que as suas posições favorecem a ação catalítica da enzima. O sítio ativo continua a sofrer modificações até que o substrato esteja completamente ligado, sendo determinada neste momento a sua conformação final.

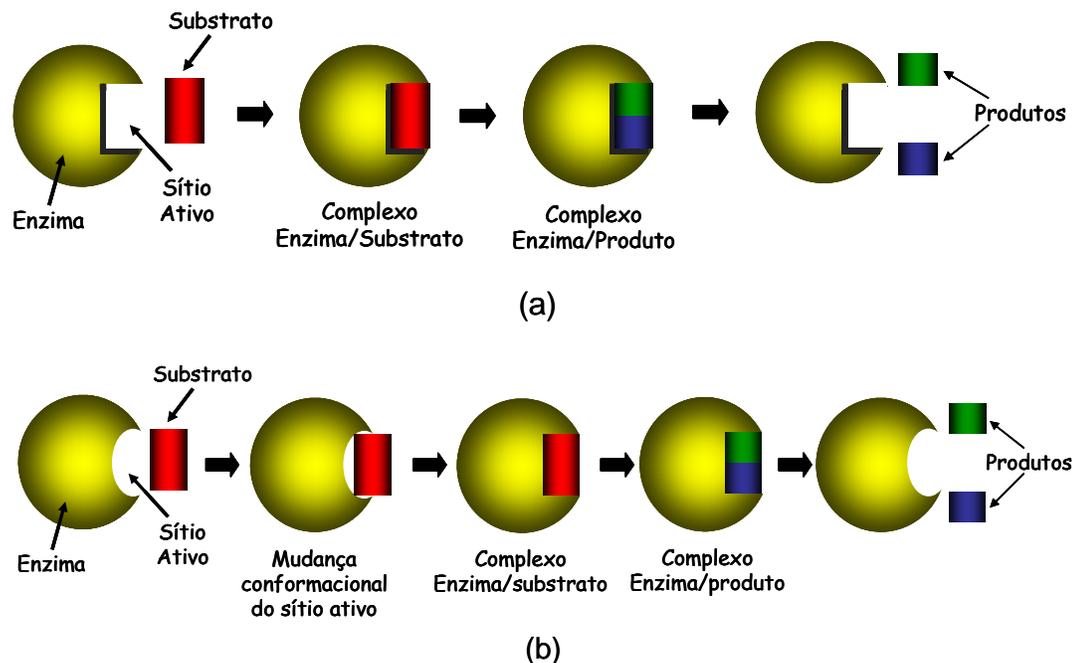


Figura 5: Modelo (a) chave-fechadura e (b) encaixe induzido.

1.3. CINÉTICA ENZIMÁTICA

A cinética de uma enzima é estudada avaliando-se a quantidade de produto formado ou a quantidade de substrato consumido por unidade de tempo de reação. No modelo de uma reação cinética existe uma reação bimolecular inicial entre a enzima (E) e o substrato (S) para formar o complexo (ES) como pode ser observado pela Equação 2. O complexo ES tem uma energia de ativação ligeiramente menor que a do substrato isolado, e a sua formação leva ao aparecimento do estado de transição. Numa segunda etapa, mais lenta, o complexo ES é desfeito liberando o produto reacional e a enzima livre que irá combinar-se com outra molécula do substrato (S) (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; BERG et al., 2002; MIKKELSEN e CORTÓN, 2004).



Todavia, à medida que a quantidade de substrato aumenta a enzima satura-se, atingindo o equilíbrio estacionário onde a reação alcança a sua velocidade máxima (V_{\max}) (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; MIKKELSEN e CORTÓN, 2004).

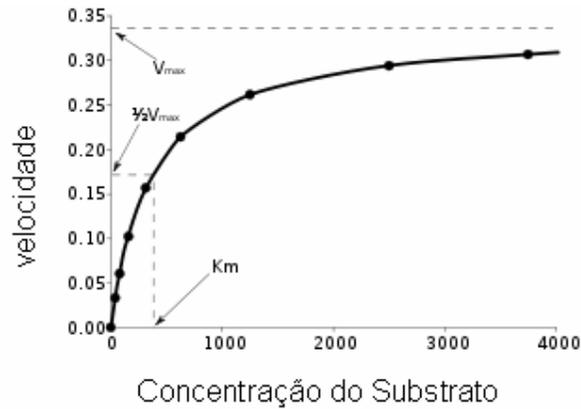


Figura 6: Concentração de substrato *versus* velocidade da reação Enzimática (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Michaelis-Menten_saturation_curve_of_an_enzyme_reaction.svg).

Leonor Michaelis e Maud Menten em 1913 definiram uma constante (K_M) para estabelecer a relação entre a concentração do substrato e a velocidade da reação enzimática (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; BERG et al., 2002) apresentado na Equação 3.

$$V = \frac{V_m [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Eq. 3.}$$

onde: V = velocidade de reação

V_m = velocidade máxima

K_M = constante de Michaelis-Menten

$[S]$ = concentração do substrato

A constante de dissociação do equilíbrio envolvendo o complexo ES é conhecida pela constante de Michaelis-Menten, K_M (Eq. 4) em que:

$$K_M = \frac{K_1 + K_2}{K_1} \quad \text{Eq. 4.}$$

O K_M de um substrato para uma enzima específica é característico, fornecendo um parâmetro de especificidade entre substrato-enzima. Deste modo, quanto menor o valor de K_M , maior será a sua especificidade (LEHNINGER, 1995; BERG et al., 2002).

1.4. POLIFENOL OXIDASE

A enzima polifenol oxidase, PFO (E.C. 1.14.18.1) é responsável pelo escurecimento observado quando frutas e vegetais são descascados, cortados ou amassados, através da oxidação enzimática de compostos fenólicos catalisados pela enzima na presença do oxigênio molecular, acarretando perdas econômicas consideráveis, além da diminuição da qualidade nutritiva e alteração do sabor (KUMAR et al., 2008; SHARMA et al., 2009; ZAMORANO et al., 2009). Esta enzima também é responsável pela síntese da melanina e pela coloração dos olhos e dos cabelos em humanos (BABU et al., 2008; NILLIUS et al., 2008; DECKER et al., 2007).

As PFOs (Figura 7) são metaloproteínas contendo no sítio ativo dois átomos de Cu(II), cada um coordenado a três moléculas de histidina

(PERALTA et al., 2006). São amplamente distribuídas em plantas e também em microorganismos (bactérias, protozoários e fungos).

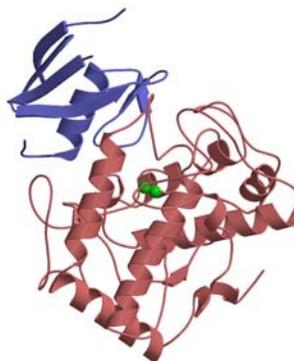
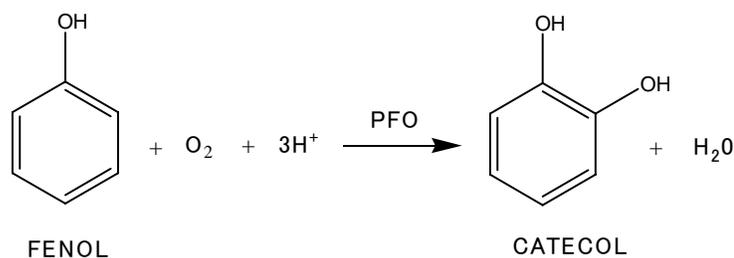
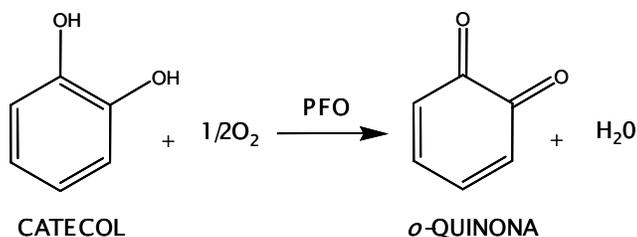


Figura 7: Estrutura tridimensional da polifenol oxidase (<http://home.hiroshima-u.ac.jp/sugil/tyrc.JPG>).

A enzima PFO, presente em grande quantidade em cogumelos, foi descoberta em 1895 por Bourquelot e Bertrand, e ficou primeiramente conhecida como tirosinase, pois o primeiro substrato usado para sua determinação foi a tirosina. Ela é também conhecida como catecol oxidase, catecolase e cresolase e catalisa tanto a hidroxilação de monofenóis (e.g. tirosina, fenol, etc) a o-difenóis (Eq. 5), assim como a oxidação de o-difenóis (e.g. catecol, L-dopa, dopamina, adrenalina, etc) a sua correspondente *o*-quinona (Eq. 6) (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002; LUPETTI et al., 2003).



Eq. 5



Eq. 6

As *o*-quinonas formadas polimerizam-se reagindo com aminoácidos endógenos e proteínas para formar pigmentos marrons (KUMAR et al., 2008; IMM e KIM, 2009; FU et al., 2007).

A PFO tem sido isolada de várias fontes, tais como banana, pêra, maçã, entre outras. O pH ótimo para sua atuação varia com a origem da enzima e a natureza do substrato. Na maioria dos casos, o seu pH ótimo encontra-se na faixa entre 6,0 e 7,0, tendo atividade menor em pHs abaixo ou acima desses valores. (KUMAR et al., 2008).

A PFO é considerada uma enzima de baixa estabilidade térmica. A exposição do tecido por curto período de tempo a temperaturas acima de 70 °C é suficiente, na maioria dos casos, para reduzir ou eliminar sua atividade catalítica. A diminuição da atividade em altas temperaturas deve-se ao desdobramento da estrutura terciária (KUMAR et al.; 2008).

1.5. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Enzimas tornaram-se uma poderosa ferramenta catalítica em uma ampla variedade de processos químicos (PEREIRA et al., 2003), incluindo as áreas de biossensores, bioreatores e catalisadores em reações orgânicas (KLOTZBACH et al., 2008; DALLA-VECCHIA et al., 2004). Porém, o curto tempo de vida das enzimas em solução na sua forma nativa limita a sua utilização. Desta forma, o principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com menor sensibilidade a interferentes e maior estabilidade quanto às mudanças por fatores químicos, físicos ou biológicos em comparação a sua forma livre, podendo alcançar mais de 45 dias de atividade catalítica na sua forma imobilizada (KIM et al., 2006; DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Como em reações químicas e bioquímicas a reutilização de enzimas livres é limitada e seu descarte é economicamente inviável, o uso de enzimas imobilizadas também oferece vantagens como o controle da formação do produto e facilidade da sua remoção no meio reacional (ALTUN e CETINUS, 2007). Entretanto, a idéia de reutilizar enzimas implica na sua estabilidade, que deve ser alta o suficiente para ser um processo adequado (MATEO et al., 2007).

As propriedades de imobilização de enzimas são governadas tanto pelas suas propriedades como pelo seu material de suporte. Um suporte criteriosamente escolhido pode melhorar significativamente o desempenho do sistema de imobilização (JAHNZ et al., 2003).

Diferentes procedimentos para imobilização de enzimas vêm sendo desenvolvidos (Figura 8). Em geral, os métodos podem ser classificados em adsorção física, onde a enzima não sofre nenhuma alteração em sua estrutura química, e ligação química, onde a enzima é quimicamente ligada ao suporte por ligações covalentes (ALTUN e CETINUS, 2007).

Entre estes métodos, a adsorção da enzima em um suporte sólido é a forma mais fácil de execução e o mais antigo protocolo de imobilização física (KARA et al., 2005; DALLA-VECCHIA et al., 2004). Neste método, as enzimas unem-se ao suporte através de ligações de baixa energia (ligações de hidrogênio, iônicas ou forças de van der Waals) sem qualquer modificação química. Todavia, com a aplicação desta técnica na construção de biossensores teremos uma baixa estabilidade operacional, uma vez que o biocatalisador pode lixiviar do eletrodo (OLIVEIRA e VIEIRA, 2006 B; VILLENEUVE et al., 2000; MIKKELSEN e CORTÓN, 2004).

As técnicas de encapsulamento e oclusão consistem em aprisionar a enzima em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. Neste sistema é criada uma membrana seletiva que impede a difusão das enzimas através da membrana polimérica, enquanto que moléculas de baixa massa molar (substratos e produtos) difundem-se facilmente. A vantagem deste método é a obtenção de uma maior estabilidade quanto às alterações do ambiente da enzima que não reage quimicamente com o suporte, sem comprometimento de seu sítio ativo. Porém, neste processo de imobilização a atividade enzimática pode ser prejudicada devido a efeitos difusionais do substrato através da membrana afetando o tempo

de resposta do biossensor (DALLA-VECCHIA et al., 2004; VILLENEUVE et al., 2000; MIKKELSEN e CORTÓN, 2004).

A imobilização covalente baseia-se na reação entre grupos funcionais terminais das enzimas, não essenciais à atividade catalítica, com grupos reativos dos suportes. Desta forma, os suportes devem possuir grupos funcionais que possam ser ativados. Os principais aminoácidos usados para ligação covalente de uma enzima são: lisina, tirosina, cisteína e histidina. O emprego do método de ligação covalente para o preparo de biossensores pode levar a uma melhor estabilidade operacional, uma vez que dificilmente a enzima irá desprender-se do suporte formando uma ligação irreversível (VILLENEUVE et al., 2000; MIKKELSEN e CORTÓN, 2004).

Na ligação covalente cruzada, reagentes bi ou multifuncionais são utilizados para reagirem com os grupos livres contidos na cadeia protéica formando uma rede polimérica entre o suporte, assim como a formação de ligações cruzadas entre as moléculas de enzima e do suporte. As ligações de enzimas por este método são irreversíveis, apresentando uma elevada resistência a variações de pH e temperatura, propiciando suportes de alta atividade e resistência à desnaturação. A desvantagem desta técnica se dá devido à sensibilidade de algumas enzimas à reação de reticulação (MIKKELSEN e CORTÓN, 2004; VILLENEUVE et al., 2000).

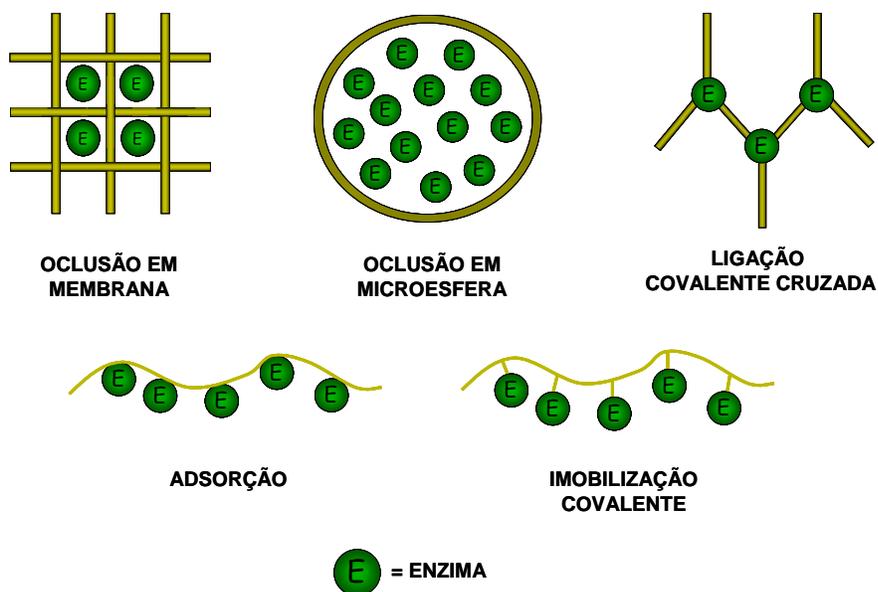


Figura 8: Técnicas de imobilização de enzimas.

1.6. QUITOSANA

Quitosana (QTS) é um polissacarídeo obtido da desacetilação parcial da quitina em meio alcalino, constituída de unidades $\beta(1,4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (Figura 9A) e $\beta(1,4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (Figura 9B). A maioria dos grupamentos acetamido ($-\text{NHCOCH}_3$) na quitina, durante a reação de hidrólise alcalina, é transformada em grupos amino ($-\text{NH}_2$) ao longo da cadeia polimérica.

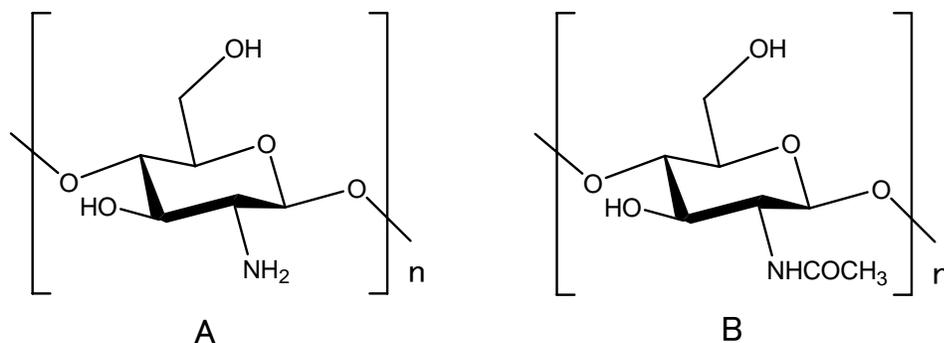


Figura 9: Estruturas químicas das unidades (A) $\beta(1,4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e (B) $\beta(1,4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-licopirranose.

Embora a estrutura da QTS seja representada como um homopolímero, a operação de desacetilação é raramente completa e a maioria dos produtos comerciais é de copolímeros compostos por unidades repetidas de quitosana e quitina alternadamente (Figura 10) (KRAJEWSKA, 2004; YEN et al., 2009). Estes copolímeros são caracterizados pelo seu grau de acetilação, que é a razão molar média de unidades de N-acetil-D-glucosamina em uma cadeia macromolecular (ONÉSIPPE e LAGERGE, 2008). Assim, qualquer polímero quitina que possua um grau de acetilação menor que 60%, já pode ser considerado QTS (VARMA et al., 2004). A QTS possui três tipos de grupos funcionais reativos: um grupo amino, um grupo hidroxila primário e um grupo hidroxila secundário (SUH e MATTHEW, 2000).

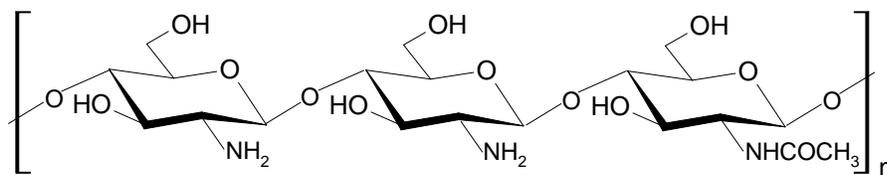


Figura 10: Estrutura química da quitosana.

Por ser um polieletrólito que contém os grupos hidroxila e amino distribuídos de maneira randômica ao longo da sua cadeia polimérica é capaz de reagir com diferentes compostos como glutaraldeído, glioxal (GUPTA e JABRAIL, 2006), formaldeído (KLOTZBACH et al., 2008), epícloridrina (OLIVEIRA et al., 2006 A), carbodiimida (OLIVEIRA et al., 2006 B), entre outros, para promover ligações covalentes com estes agentes reticulantes. Em meio ácido, os grupos amino da QTS são protonados sendo assim um material solúvel em meio aquoso. As cargas positivas formadas podem sofrer interações com diversos ânions como, por exemplo, tripolifosfato de sódio (FERNANDES et al., 2008), sulfato de sódio e citrato de sódio (GUPTA e JABRAIL, 2007) permitindo a fabricação de géis, membranas e micropartículas usadas principalmente como suporte ideal para imobilização de enzimas (ALTUN e CETINUS, 2007).

Devido às suas propriedades como baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, fungicida e antitumoral, este polímero vem sendo largamente empregado na medicina, em produtos farmacêuticos, na agricultura, em biotecnologia, na indústria de

alimentos, e tratamento de efluentes industriais (ONÉSIPPE e LAGERGE, 2008).

1.7. LÍQUIDO IÔNICO

A química dos líquidos iônicos (LI) foi impulsionada em 1914 por Paul Walden como alternativa para diminuir a temperatura de eletrólitos de baterias, onde o composto obtido, nitrato de etilamônio, formado pela reação de etilamina e ácido nítrico concentrado, apresentou baixo ponto de fusão (12 °C) (CONSORTI et al., 2001).

Os LI são compostos formados por grandes cátions orgânicos (i.e., imidazóis, piridinas, pirrolidinas, piperidíneos) juntamente com ânions na sua maioria inorgânicos (i.e., Cl^- , PF_6^- , BF_4^-), com ponto de fusão abaixo dos 100 °C (BENNET e LEO, 2004; ANDERSON et al., 2006). A grande diferença no tamanho do cátion volumoso comparado com o pequeno tamanho do ânion provoca uma desorganização dos íons, que por isto se encontram na forma líquida em temperatura ambiente (WEI e IVASKA, 2008).

Uma característica peculiar dos LIs é a ampla possibilidade de variação de suas propriedades físico-químicas, alcançada através de diferentes combinações entre os cátions e ânions que são empregados na sua síntese (CONSORTI et al., 2001).

Nos últimos anos, a substituição dos solventes orgânicos voláteis e nocivos utilizados na indústria tornou-se um grande interesse como uma

parte de novas tecnologias denominadas “química verde”. Devido a sua baixa pressão de vapor, sendo, portanto pouco inflamáveis, os LIs estão recebendo grande atenção como promissores substitutos dos solventes tradicionais (CONSORTI et al., 2001; LUCZAC et al., 2008).

As vantagens dos LIs incluem propriedades como alta estabilidade química e térmica, baixa volatilidade, alta polaridade, excelente condutividade iônica, são líquidos à temperatura ambiente, possuem ampla janela eletroquímica de potencial e muitas catálises enzimáticas apresentaram um aumento de atividade e estabilidade comparadas com solventes orgânicos convencionais (WANG et al., 2007 A). Porém, o elevado preço comparado com solventes orgânicos tradicionais, dificuldade de purificação e também sua alta viscosidade, que dificulta a agitação e a homogeneização, tornando lenta a dissolução de algumas substâncias sólidas, são desvantagens apresentadas pelos LIs (DUPONT e SUAREZ, 2006).

O uso de LIs expandiu-se para diversas áreas como síntese orgânica e inorgânica, catálise, formação de metais nanoestruturados, processo de extração líquido-líquido, polimerização, (CONSORTI et al., 2001; WEI e IVASKA, 2008) aplicação em química analítica, incluindo sensores, química bioanalítica e biossensores eletroquímicos (PAULIUKAITE et al.; 2008). Na eletroquímica, estes materiais vêm sendo utilizados como substitutos dos tradicionais aglutinantes na construção de eletrodos de pasta de carbono, devido ao fato de apresentarem uma

elevada janela eletroquímica de potencial e alta condutividade iônica (WEI et al., 2007; SAFAVI et al., 2006).

Uma das classes mais comuns de LIs é aquela baseada em cátions imidazóis. Os primeiros sais imidazóis estáveis foram descritos por Wilkes e colaboradores no início dos anos 90, e continuam em suas estruturas ânions como o tetrafluorborato (BF_4^-) e de hexafluorofosfato (PF_6^-). Estes LIs tornaram-se muito populares, devido principalmente à facilidade de síntese, grande variação de suas propriedades físico-químicas com a natureza do ânion e dos substituintes do anel imidazol e sua alta estabilidade térmica, com decomposição acima de 400 °C (DUPONT e SUAREZ, 2006). Uma propriedade atrativa do LI contendo o cátion imidazol é o seu potencial para estabilização de espécies metálicas (SCHEEREN et al., 2006), e que, devido a sua alta atividade catalítica, poderiam ser aplicados em diversas áreas, incluindo catálise, dispositivo para armazenamento de energia, dispositivos magnéticos, liberação de drogas, sensores elétricos, entre outros (DASH et al., 2008; BARON et al., 2005; VENKATACHALAM et al., 2008).

LIs estabilizam nanopartículas metálicas em função da sua alta carga iônica, alta polaridade, alta constante dielétrica e rede supramolecular, proporcionando uma espécie de "concha protetora" para as nanopartículas metálicas, sendo que nenhuma molécula extra ou solvente orgânico seja necessário (REDEL et al., 2008).

Nanopartículas metálicas normalmente são utilizadas em biossensores amperométricos na detecção eletroquímica de alguns

compostos que apresentam o potencial de oxidação relativamente alto *versus* o eletrodo de referência como Ag/AgCl. Conseqüentemente ocorre a cooxidação de substâncias eletroquimicamente ativas que também podem ser oxidadas na superfície do eletrodo resultando em correntes interferentes indesejáveis. Na tentativa de superar este problema, modificações dos eletrodos vêm sendo utilizadas com a introdução de metais eletrocatalíticos como platina, ródio, rutênio, paládio, irídio, etc (LEE et al., 2007). Estas partículas metálicas dispersas apresentam atividade eletrocatalítica em potenciais relativamente baixos onde a co-oxidação de interferentes no eletrodo de trabalho é negligenciada. Nanopartículas metálicas também são utilizadas frequentemente na transferência de elétrons do centro redox da enzima até a superfície do eletrodo (SARMA et al., 2008; SHEN et al., 2007).

1.8. ÁCIDO CLOROGÊNICO

Os ácidos fenólicos são estruturalmente fenóis simples que incluem dois grupos: ácidos hidroxicinâmicos e ácidos hidroxibenzóicos (ANDJELKOVIC' et al., 2006). O ácido clorogênico é um ácido fenólico formado pela esterificação dos ácidos cafeico e quínico e sua estrutura química está representada na Figura 11.

Muitas plantas são fontes do ácido clorogênico, sendo o café uma das bebidas mundialmente populares e a maior fonte deste ácido na dieta humana (LAFAY et al., 2006; MOCCELINI et al., 2008).

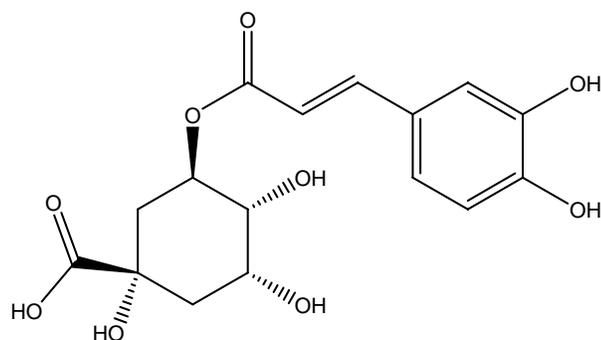


Figura 11: Estrutura química do ácido clorogênico.

Estudos experimentais mostraram efeitos positivos quando este ácido é ingerido regularmente, indicando que o composto apresenta atividade antioxidante, anticarcinogênica e antimutagênica, assim como possui também efeitos analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios (LEE et al., 2008; VAHER e KOEL, 2003; MOCCELINI et al., 2008). Entretanto, a maioria dos consumidores se preocupa com a quantidade excessiva de café ingerida, devido ao sintoma de refluxo causado pelos componentes dos ácidos presentes. Apesar da grande quantidade do ácido clorogênico no café este se hidrolisa facilmente ao ácido cafeico e quínico na etapa de torração gerando um gosto amargo (FUJIOKA e SHIBAMOTO, 2008; WANG et al., 2007 B, MOCCELINI et al., 2008). Portanto, é muito importante estabelecer métodos quantitativos para monitorar a concentração de ácido clorogênico em todos os tipos de amostras comerciais.

Diversos métodos analíticos têm sido propostos para a determinação de ácido clorogênico, sendo que a maioria está baseada na determinação através de cromatografia líquida (FRANK et al., 2008; HU et

al., 2008; KRIZMAN et al., 2007; LIU et al., 2008; LIU et al., 2009; MARÍN-MARTINEZ et al., 2009; MARQUES e FARAH, 2009; MATTILA e HELLSTROM, 2007). Os métodos de eletroforese capilar (SAFRA et al., 2007; VAHER e KOEL, 2003; WANG et al., 2007 C), quimiluminescência (WANG et al., 2007 B) e eletroanalíticos (CARVALHO et al., 2008) (MOCELLINI et al., 2008) (SANZ et al., 2005) representam alternativas aos métodos cromatográficos para a determinação de ácido clorogênico.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo imobilizar a enzima polifenol oxidase, obtida da fruta do conde, em quitosana ionicamente reticulada com oxalato de sódio e utilizar este material na construção de um biossensor juntamente com o líquido iônico hexafluorofosfato de 1-n-butil-3-metilimidazol contendo nanopartículas de irídio (Ir-BMI.PF₆). Este biossensor será otimizado e utilizado para a determinação de ácido clorogênico em café orgânico e descafeinado.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter um homogenato da fruta do conde contendo a enzima polifenol oxidase;
- Determinar a atividade da enzima pelo método espectrofotométrico;
- Reticular o biopolímero quitosana com oxalato de sódio;
- Imobilizar a enzima em quitosana previamente reticulada;
- Construir o biossensor contendo polifenol oxidase imobilizada em quitosana reticulada e líquido iônico;
- Otimizar os parâmetros analíticos usando a técnica de voltametria de onda quadrada;

- Aplicar o biossensor na determinação de ácido clorogênico em café orgânico e descafeinado;
- Comparar o teor de ácido clorogênico nas amostras de café selecionadas usando o biossensor proposto e a técnica de eletroforese capilar.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

As soluções foram preparadas empregando-se água deionizada e todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada dissolvendo-se em água destilada 11,998 g de monohidrogenofosfato de potássio (Vetec) e 14,196 g de dihidrogenofosfato de potássio (Vetec) em um béquer. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 1,0 L onde foi completado o volume. Para o ajuste dos pHs 7,0 a 9,0 foram adicionadas gotas de hidróxido de sódio (F. Maia) $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. Para o ajuste do pH 6,0 foram adicionadas gotas de ácido fosfórico concentrado (Nuclear).

Para o preparo da solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi dissolvido 8,2 g de acetato de sódio (F. Maia) em um béquer contendo água destilada e adicionado 5,7 mL de ácido acético concentrado (CRQ). Posteriormente a solução foi transferida para um balão de 1,0 L, onde completou-se o volume com água destilada. Para o ajuste do pH 5,0 foram adicionadas gotas de hidróxido de sódio (F. Maia) $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Na determinação da atividade enzimática da polifenol oxidase obtida da fruta do conde foi utilizada uma solução de catecol (Aldrich) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ preparada mediante diluição de 0,55 g do reagente catecol em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) em um balão volumétrico de 100 mL .

A quitosana utilizada como suporte para imobilização da enzima foi obtida da Sigma apresentando um grau de desacetilação de 85%.

Solução de oxalato de sódio (Merck) usado como reticulante do biopolímero quitosana foi preparada solubilizando-se 2,5 g do reagente em um balão volumétrico de 50 mL e completando-se o volume com água destilada.

Solução de ácido clorogênico (Sigma) $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foi preparada diariamente pela dissolução de 1,8 mg deste reagente em balão volumétrico de 10 mL com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0).

3.2. INSTRUMENTAÇÃO

Para a obtenção da enzima polifenol oxidase foi utilizado um liquidificador da marca Black & Decker modelo IB900 onde posteriormente o material foi filtrado em funil contendo quatro camadas de gaze. Para a centrifugação do extrato foi utilizada uma centrífuga Hitache modelo Himac CR 20B2.

Um espectrofotômetro da Micronal modelo B572 e cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico foram usados na obtenção das medidas de absorbância para a determinação da atividade do extrato enzimático.

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato-galvanostato da Autolab PGSTAT12 (Eco Chemie, Suécia) utilizando um software da GPES versão 4.9.006, Eco Chemie. Uma célula de vidro, com

tampa de PVC sem compartimento divisório foi utilizado contendo 10 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) juntamente com alíquotas de solução padrão de ácido clorogênico ou alíquotas das amostras de café. Os três eletrodos empregados foram o biossensor construído no laboratório utilizado como eletrodo de trabalho, uma placa de platina ($0,5 \text{ cm}^2$) usada como eletrodo auxiliar e o eletrodo de Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$ KCl) como eletrodo de referência como mostra a Figura 12.

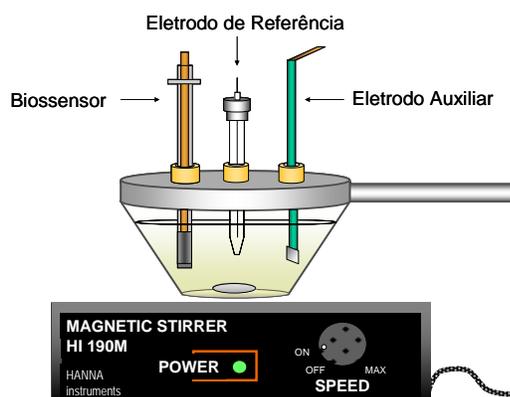


Figura 12: Representação da célula eletroquímica contendo o eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar.

As morfologias das pastas de carbono contendo nujol ou Ir-BMI.PF₆ foram analisadas no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM-LaBMAT) do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina. As pastas foram colocadas sobre uma superfície de carbono contendo uma fita de dupla face e em seguida foram cobertas com uma camada de ouro para formar um filme condutor utilizando um metalizador (Blazers SCD 005, Liechtenstein). As pastas

foram observadas usando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da PHILIPS, modelo XL30 com uma voltagem de 15 Kv e magnitudes de 500 e 1000 vezes.

A técnica de eletroforese capilar utilizada como método comparativo foi realizada empregando um equipamento de eletroforese capilar (Agilent Technologies, modelo HP^{3D}CE, Palo Alto, CA, USA), equipado com um detector de arranjo de diodos mantendo a temperatura a 25 °C. Um "software" da HP Chemstation[®] foi usado para tratamento dos dados. Foi utilizado um capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliacrilato (48,5 cm x 50 µm D.I. x 375 µm D.E.) obtido da Microtube (Araraquara).

3.3. METODOLOGIA

3.3.1. Obtenção do extrato bruto enzimático

Após lavar a fruta do conde (*Annona squamosa*) obtida no mercado local, uma massa de 25,0 g foi picada e homogeneizada em um liquidificador juntamente com 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). O homogenato foi filtrado em quatro camadas de gaze e posteriormente centrifugado a 18000 rpm por 5 min a uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi armazenado em frasco âmbar em um refrigerador e usado como fonte da enzima polifenol oxidase.

3.3.2. Determinação da atividade enzimática da polifenol oxidase

A atividade da polifenol oxidase foi obtida utilizando uma cubeta de quartzo contendo 2,8 mL da solução de catecol ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) e 0,2 mL do extrato bruto enzimático preparados em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). A reação foi acompanhada espectrofotometricamente em 420 nm com o surgimento da quinona a cada 10 s por um período de 2 min.

Uma unidade de atividade (unidade mL^{-1}) é definida como a quantidade da enzima polifenol oxidase que causa um aumento de 0,001 unidades de absorvância por minuto (FATIBELLO-FILHO e VIERA, 2002; MIKKELSEN e CORTÓN, 2004).

3.3.3. Reticulação da quitosana

A quitosana usada como suporte para imobilização da enzima foi preparada a partir de 1,0% m/v desse polímero dissolvido em solução aquosa de ácido acético (3,0% v/v) sob agitação vigorosa por aproximadamente 1 h em temperatura ambiente. Três gotas de Tween 80 (2,0% v/v) foram adicionadas na solução para facilitar a separação das partículas de quitosana reticulada. Em seguida, foi adicionado 50,0 mL de oxalato de sódio (5,0% m/v) sob agitação. A quitosana reticulada foi separada por centrifugação utilizando uma velocidade de 3000 rpm por 10 min, lavada com tampão fosfato pH 7,0, filtrada e seca à temperatura ambiente.

3.3.4. Imobilização da enzima no suporte quitosana

Alíquotas de 230 a 540 μL do extrato enzimático da fruta do conde contendo 300 a 1500 unidades mL^{-1} da enzima polifenol oxidase foram adicionadas sobre 30,0 mg de quitosana em pó, reticulada ionicamente com oxalato. Após 1 h sob agitação mecânica ocasional, o material foi mantido em temperatura ambiente para se obter um pó seco onde posteriormente foi armazenado em temperatura ambiente.

3.3.5. Construção do biossensor

Os biossensores foram preparados homogeneizando-se por 20 minutos em almofariz uma massa de 30,0 mg de quitosana ionicamente reticulada com oxalato contendo 1200 unidades mL^{-1} de polifenol oxidase juntamente com 70,0 mg de pó de grafite Archeson #38 (Fischer). Posteriormente, 4 gotas de Ir-BMI.PF_6 foram adicionadas e o material foi macerado por mais 20 min para se obter uma mistura homogênea. A pasta foi inserida em uma seringa de 1,0 mL contendo 1,0 mm de diâmetro interno e um fio de cobre foi introduzido para obtenção do contato elétrico.

3.3.6. Medidas eletroquímicas

Voltamogramas de onda quadrada foram registrados utilizando uma célula eletroquímica contendo 10 mL da solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0) juntamente com alíquotas da solução padrão de ácido clorogênico após um tempo de agitação de 60 s para homogeneização da solução. Para as medidas eletroquímicas foram utilizadas varreduras de potencial de +0,10 a +0,40 V, frequência de 30,0 Hz; amplitude de pulso de 100,0 mV e incremento de 1,0 mV. Usando esses parâmetros as curvas analíticas foram construídas e o estudo de recuperação e determinação de ácido clorogênico nas amostras de café foram obtidas.

3.3.7. Preparo das amostras

As quatro amostras de café utilizadas neste trabalho foram obtidas no mercado local sendo duas amostras de café orgânico (A e B) e duas de café descafeinado (C e D). Para a determinação de ácido clorogênico nessas amostras uma massa de 1,5 g de café solúvel (A, C) e 3,0 g de café instantâneo (B e D) foram preparados em água quente (~ 80 °C). Para as medidas eletroquímicas alíquotas de 30 µL das amostras de café foram transferidas para uma célula contendo 10 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0).

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Após a obtenção do extrato enzimático obtido da fruta do conde (*Annona Squamosa*) a atividade da enzima polifenol oxidase foi investigada espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 420 nm com o surgimento da *o*-quinona formada a partir da reação do catecol juntamente com a enzima polifenol oxidase como pode ser observado na Figura 13.

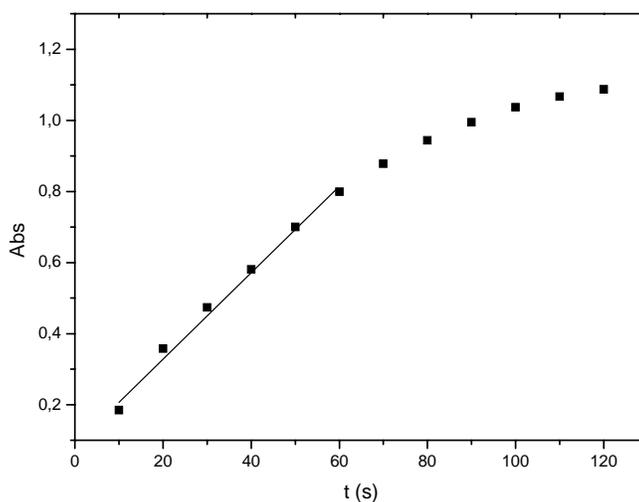


Figura 13: Determinação da atividade enzimática da polifenol oxidase.

A partir do gráfico obtido, pode-se calcular a atividade da polifenol oxidase através da Equação 7 fazendo uso apenas da parte linear do gráfico.

$$\text{Atividade} = \frac{\Delta \text{Abs} \times 1000}{\Delta t \text{ (min)} \times 0,2} \quad \text{Eq. 7}$$

Portanto, substituindo-se os valores na Equação 7, temos:

$$\text{Atividade} = \frac{(0,799 - 0,185) \times 1000}{(60 - 10) / 60 \times 0,2} \quad \therefore$$

| |
|--|
| Atividade = 3.685,47 unidades mL ⁻¹ |
|--|

4.2. RETICULAÇÃO DA QUITOSANA E IMOBILIZAÇÃO DA POLIFENOL OXIDASE

Técnicas de imobilização são ferramentas importantes para aumentar as propriedades das enzimas como estabilidade, atividade, especificidade e reduzir as inibições (MATEO et al., 2007).

A eficiência na imobilização de uma enzima é dependente tanto do suporte empregado como da enzima selecionada. O material de suporte das enzimas deve possuir uma série de características, incluindo: elevada afinidade às proteínas, disponibilidade de grupos funcionais reativos para reagir diretamente com as enzimas e para modificações químicas, estabilidade mecânica e rigidez, biodegradabilidade e baixo custo (KRAJEWSKA, 2004).

A quitosana possui propriedades químicas e biológicas distintas. Na sua cadeia linear de elevada massa molar, a quitosana possui grupos

aminos e hidroxilas reativos, propícios as modificações químicas (KRAJEWSKA, 2004).

A preparação do suporte de quitosana para imobilização da polifenol oxidase está baseada na interação iônica entre as cargas positivas dos grupos aminos presentes, tornando a quitosana um polieletrólito catiônico ($pK_a \approx 6,5$). Quando dissolvido em meio ácido possui elevada carga positiva sobre os grupos $-NH_3^+$, que adere à superfície carregada negativamente do contra íon bivalente de oxalato. Existem muitas vantagens de se utilizar este método, incluindo o uso de solução aquosa e a possibilidade de entrapamento de proteínas e DNA (ZHANG e KOSARAJU, 2007). Desta forma a polifenol oxidase pode estar ocluída nos espaços intersticiais da quitosana reticulada apresentando maior estabilidade e sensibilidade ao biossensor. A Figura 14 apresenta uma sugestão da reação entre a quitosana, oxalato e a polifenol oxidase.

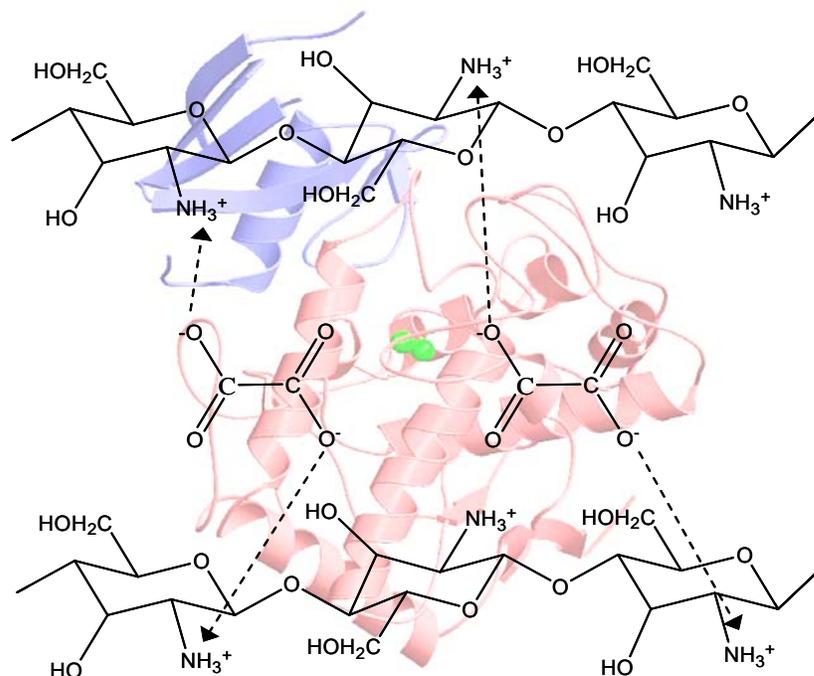


Figura 14: Imobilização da enzima em quitosana ionicamente reticulada com oxalato.

4.3. MORFOLOGIAS DAS PASTAS DE CARBONO

A aparência morfológica das pastas foi estudada usando a microscopia eletrônica de varredura (MEV), e os resultados estão apresentados na Figura 15. Diferenças consideráveis podem ser observadas entre a pasta de carbono tradicional, que utiliza nujol como aglutinante, com a pasta de carbono contendo o líquido iônico com nanopartículas Ir-BMI.PF₆. O eletrodo tradicional é caracterizado por uma superfície formada por flocos de carbono irregulares, isolados e cada camada pode ser claramente distinguida (Figura 15(A)). A pasta de carbono do biossensor proposto é mais uniforme e as camadas não se

encontram muito definidas devido à alta viscosidade do líquido iônico (Figure 15 (B)).

Devido à alta condutividade do líquido iônico, sua utilização não está limitada apenas como material aglutinante do grafite, mas pode também facilitar na transferência de elétrons na superfície do eletrodo (MALEKI et al., 2006).

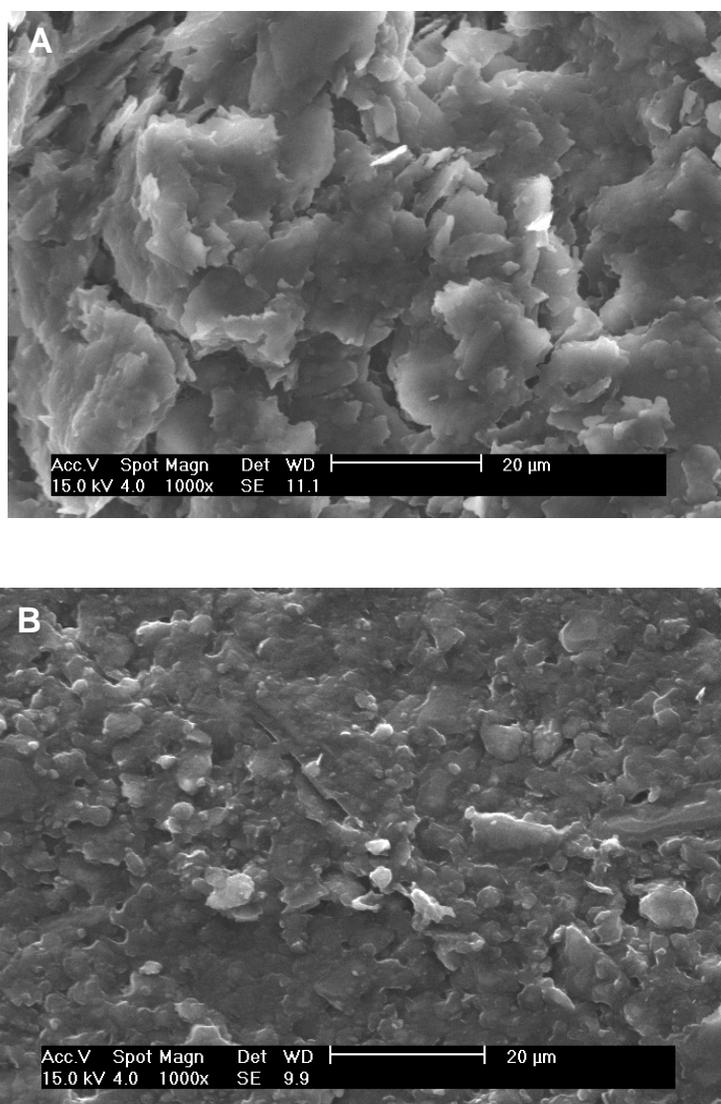


Figura 15: MEV da pasta de carbono contendo (A) nujol e (B) Ir-BMI.PF₆.

4.4. CONTRIBUIÇÃO DO LÍQUIDO IÔNICO

Para avaliar a contribuição do líquido iônico BMI.PF₆ contendo nanopartículas de irídio, diferentes sensores foram construídos e comparados usando solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) utilizando frequência de 100,0 Hz, amplitude de pulso de 100,0 mV e incremento de 5,0 mV. O comportamento eletroquímico do ácido clorogênico usando esses sensores foi investigado pela voltametria de onda quadrada em potencial de 0,0 a + 0,5 V *versus* Ag/AgCl. A Figura 16 apresenta os voltamogramas obtidos usando (a) eletrodo de pasta de carbono contendo nujol, (b) eletrodo de pasta de carbono contendo BMI.PF₆, (c) eletrodo de pasta de carbono contendo BMI.PF₆ e nanopartículas de irídio (Ir-BMI.PF₆) e (d) eletrodo de pasta de carbono contendo BMI.PF₆, nanopartículas de irídio e a enzima polifenol oxidase (Ir-BMI.PF₆-PFO). Como pode ser observada, a maior resposta para o ácido clorogênico foi obtida usando o biossensor contendo Ir-BMI.PF₆ e polifenol oxidase comparado com os outros sensores. Baseado nesses resultados pode-se garantir que o líquido iônico contendo nanopartículas de irídio oferece um ambiente favorável para a enzima, facilitando a transferência de elétrons na superfície do biossensor. Este estudo confirma a contribuição catalítica do Ir-BMI.PF₆ e a eficiência na imobilização da enzima polifenol oxidase.

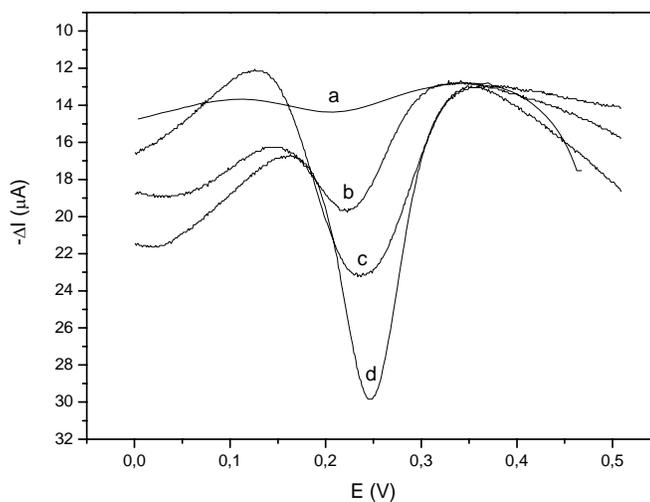


Figura 16: Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando (a) eletrodo de pasta de carbono contendo nujol, (b) eletrodo de pasta de carbono contendo BMI.PF₆, (c) eletrodo de pasta de carbono contendo Ir-BMI.PF₆ e (d) eletrodo de pasta de carbono contendo Ir-BMI.PF₆-PFO em solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e frequência de 100,0 Hz, amplitude de pulso de 100,0 mV e incremento de 5,0 mV.

4.5. REAÇÃO ENZIMÁTICA

O potencial de redução eletroquímico da quinona formada no processo enzimático foi investigado usando a voltametria de onda quadrada. A polifenol oxidase catalisa a oxidação de uma variedade de compostos fenólicos com a simultânea redução do oxigênio molecular em água. O ácido clorogênico na presença desta enzima é oxidado a sua respectiva *o*-quinona. Eletroquimicamente a *o*-quinona é reduzida ao

ácido clorogênico na superfície do biossensor proposto em potencial de +0,25 V, como ilustrado na Figura 17.

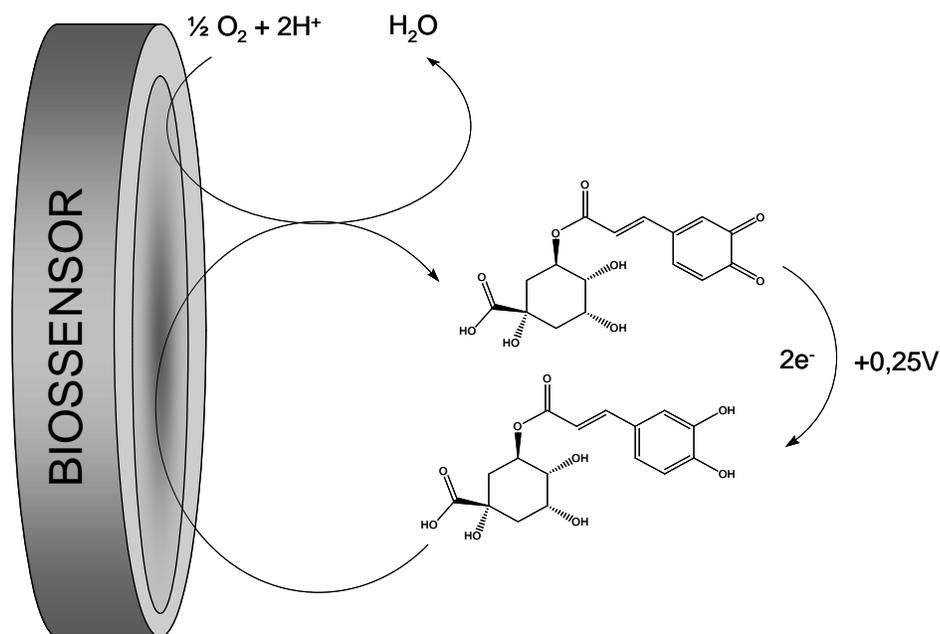


Figura 17: Representação esquemática da oxidação/redução do ácido clorogênico na superfície do biossensor.

4.6. OTIMIZAÇÃO E DESEMPENHO DO BIOSSENSOR

Para avaliar o desempenho do biossensor proposto, vários parâmetros foram investigados utilizando a voltametria de onda quadrada, entre eles a porcentagem de líquido iônico adicionado, concentração da enzima polifenol oxidase, pH, além dos parâmetros de otimização da técnica como frequência, amplitude de pulso e incremento.

4.6.1. Porcentagem de líquido iônico

Inicialmente a quantidade do líquido iônico Ir-BMI.PF₆ presente na composição da pasta de carbono foi investigada. Porcentagens de 100:0; 75:25; 50:50; 25:75 e 0:100% Nujol:Líquido iônico foi investigada para uma solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ como pode ser observado na Figura 18, utilizando frequência de 100,0 Hz , amplitude de pulso de 100,0 mV e incremento de 5,0 mV. O sinal analítico (pico da corrente resultante) aumentou consideravelmente quando 50% de líquido iônico foi adicionado na pasta juntamente com outros 50% do nujol. Este comportamento foi similar para adições crescentes de líquido iônico apresentando um leve acréscimo da resposta quando apenas líquido iônico se encontrava presente na pasta. Sendo que 100% de Ir-BMI.PF₆ apresentou uma maior sensibilidade, esta foi selecionada para a construção dos biossensores subseqüentes.

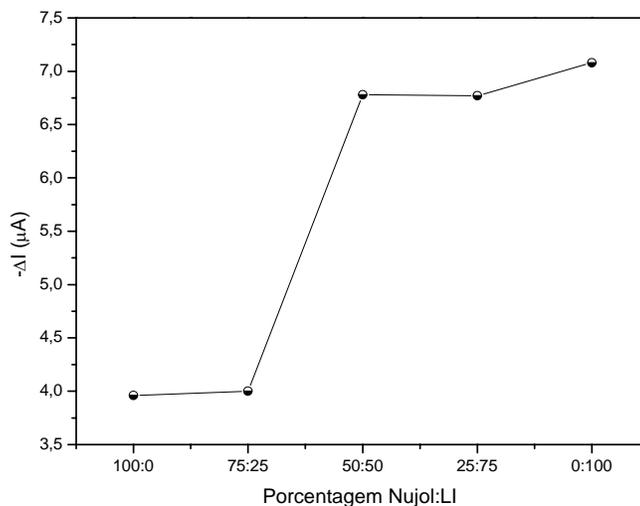


Figura 18: Estudo da porcentagem de líquido iônico no biossensor utilizando solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

4.6.2. Concentração da enzima

Para a construção dos biossensores foi realizado um estudo da quantidade de enzima PFO imobilizada em quitosana previamente reticulada na preparação da pasta. Os biossensores foram construídos contendo 300 a 1500 unidades mL^{-1} de polifenol oxidase. Os sinais analíticos (correntes de pico resultantes) em solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ usando frequência de 100,0 Hz, amplitude de pulso de 100,0 mV e incremento de 5,0 mV aumentaram até a concentração de 1200 unidades mL^{-1} da enzima, decrescendo a resposta para valores superiores como mostrado na Figura 19. Portanto, foi selecionado a

concentração de 1200 unidades mL⁻¹ de PFO baseado nestes resultados para o desenvolvimento deste trabalho.

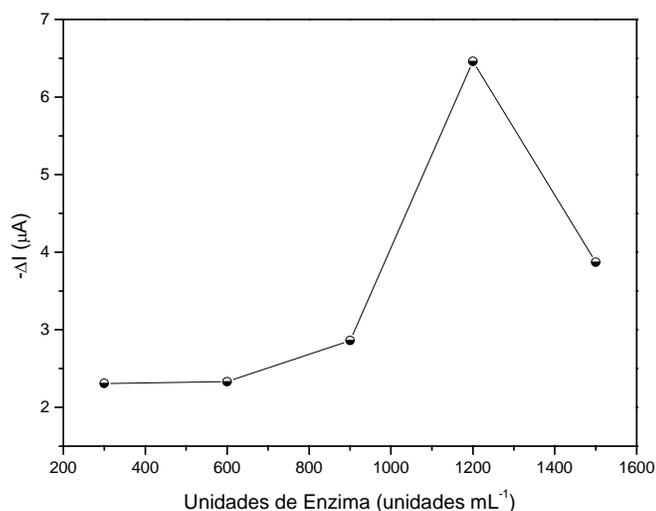


Figura 19: Estudo da concentração de enzima no biossensor utilizando solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

4.6.3. Efeito do pH

O pH exerce grande influência sobre as enzimas afetando diretamente nas reações enzimáticas e este foi investigado utilizando-se solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato ou fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) variando o pH de 5,0 a 9,0 em frequência de 100 Hz, amplitude de pulso de 100,0 mV e incremento de 5,0 mV . A Figura 20 apresenta os resultados obtidos onde a resposta máxima da corrente resultante foi encontrada em tampão fosfato pH 6,0 decrescendo os

valores de correntes para pHs inferiores. Esse valor de pH é semelhante ao encontrado por outros pesquisadores (IMM e KIM, 2009; SHARMA et al., 2009).

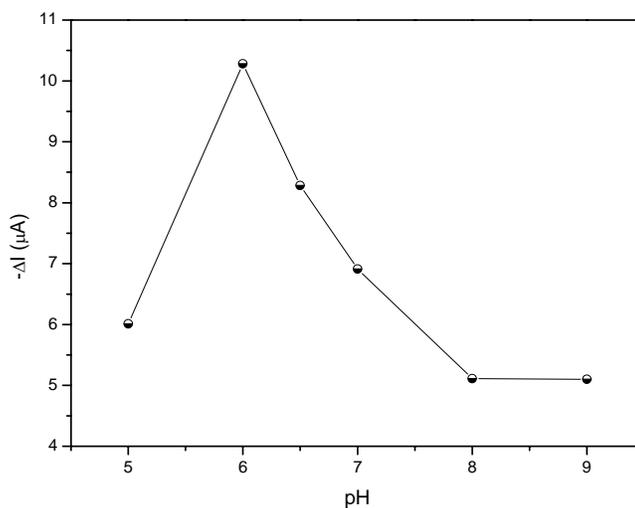


Figura 20: Efeito do pH sobre a resposta do biossensor utilizando solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

A avaliação dos parâmetros da voltametria de onda quadrada tais como, frequência, amplitude de pulso e incremento é de extrema importância para se obter uma maior resposta e sensibilidade do biossensor e, portanto foram otimizados nas condições descritas abaixo.

4.6.4. Frequência

A frequência foi investigada em intervalo de 10 a 100 Hz contendo solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) fixando a amplitude de pulso em 100,0 mV e o incremento em 5,0 mV. Quando a frequência é maior que 30 Hz a corrente de pico resultante decresce, como apresentada na Figura 21, conseqüentemente a frequência de 30 Hz foi selecionada para os demais estudos.

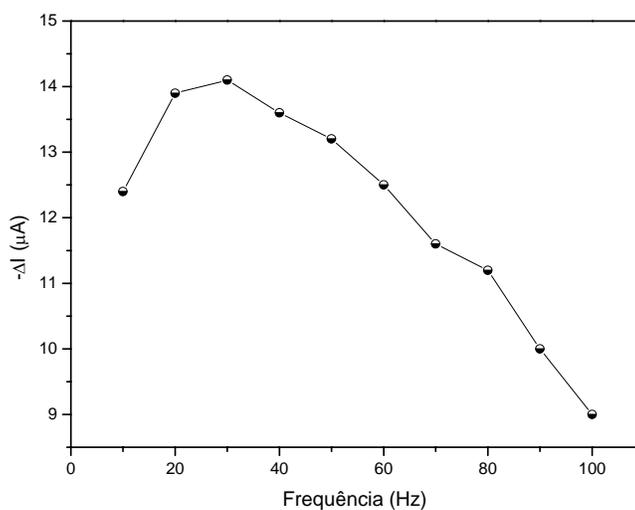


Figura 21: Estudo da frequência sobre a resposta analítica do biossensor utilizando solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0).

4.6.5. Amplitude de Pulso

A amplitude do pulso de potencial foi investigada em uma faixa de 10,0 a 100,0 mV utilizando solução ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) e frequência de 30,0 Hz e incremento de 5,0 mV. A intensidade do pico aumentou linearmente até a amplitude máxima utilizada de 100 mV, como mostra a Figura 22. Portanto, esta amplitude foi usada neste trabalho.

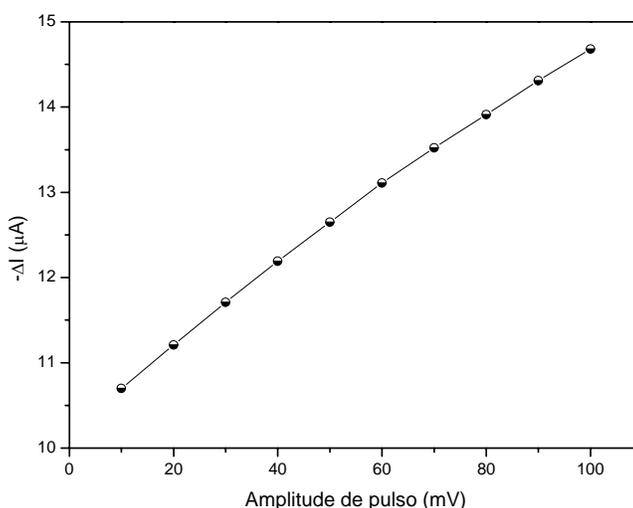


Figura 22: Estudo da amplitude de pulso sobre a resposta analítica do biossensor utilizando solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0).

4.6.6. Incremento

Além da frequência e da amplitude, o incremento também foi investigado em uma faixa de 1,0 a 10,0 mV utilizando $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorogênico e frequência de 30,0 Hz e amplitude de pulso de 100,0 mV. A maior resposta da corrente resultante foi obtida em 1,0 mV decrescendo a resposta em incrementos superiores e permanecendo praticamente constante acima de 3,0 mV (Figura 23). Deste modo foi escolhido para análise de ácido clorogênico o incremento de 1,0 mV.

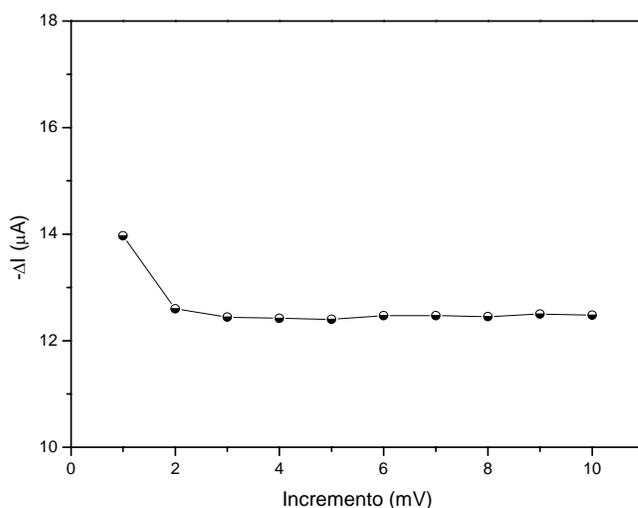


Figura 23: Estudo do incremento sobre a resposta analítica do biossensor utilizando solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0).

A Tabela 1 resume os parâmetros analíticos investigados e as maiores respostas encontradas na otimização do biossensor.

Tabela 1. Otimização dos parâmetros experimentais.

| Parâmetros | Faixa investigada | Selecionada |
|---|-------------------|-------------|
| Porcentagem de líquido iônico (%) | 0 – 100,0 | 100,0 |
| Concentração de enzima (unidades mL ⁻¹) | 300,0 – 1500,0 | 1200,0 |
| pH | 5,0 – 9,0 | 6,0 |
| Frequência (Hz) | 10,0 – 100,0 | 30,0 |
| Amplitude de pulso (mV) | 10,0 – 100,0 | 100,0 |
| Incremento (mV) | 1,0 – 10,0 | 1,0 |

4.7. VOLTAMOGRAMAS DE ONDA QUADRADA E CURVA ANALÍTICA

A curva analítica foi obtida aplicando-se as melhores condições previamente otimizadas. Para a construção da curva de calibração utilizando o biossensor proposto, foi utilizada 10 mL de eletrólito suporte (tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹; pH 6,0) na célula eletrolítica, adicionando-se volumes sucessivos da solução estoque de concentração 5,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ com o auxílio de uma micropipeta. Como mostra a Figura 24 foi obtida uma linearidade de 3,48 x 10⁻⁶ a 4,95 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ com limite de detecção de 9,15 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ (3 x desvio padrão do

intercepto/inclinação). Neste caso, a concentração de ácido clorogênico foi determinada através da seguinte relação:

$$-\Delta I = 0,4879 + 5,1621 \times 10^7 [\text{ácido clorogênico}]; r=0,9996$$

Onde ΔI corresponde a corrente de pico resultante em μA e [ácido clorogênico] a concentração de ácido clorogênico em mol L^{-1} .

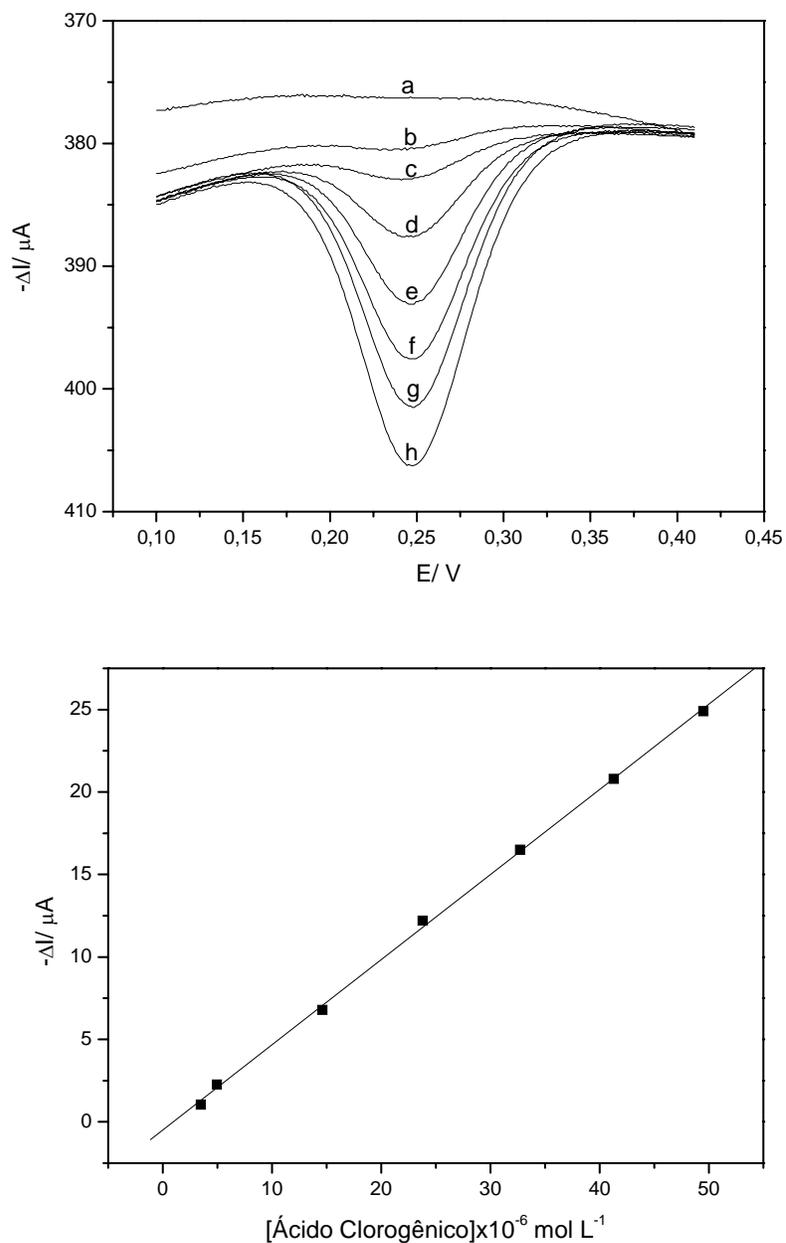


Figura 24: Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica obtida usando o biossensor proposto em (a) solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0) e com adição de ácido clorogênico: (b) $3,48 \times 10^{-6}$; (c) $4,95 \times 10^{-6}$; (d) $1,46 \times 10^{-5}$; (e) $2,38 \times 10^{-5}$; (f) $3,27 \times 10^{-5}$; (g) $4,13 \times 10^{-5}$ e (h) $4,95 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em frequência de 30 Hz, amplitude de pulso de 100 mV e incremento de 1,0 mV.

4.8. REPETIBILIDADE, REPRODUTIBILIDADE E ESTABILIDADE

O estudo da repetibilidade apresenta o grau de concordância entre os resultados utilizando o mesmo procedimento analítico a partir de sete medidas sucessivas utilizando o mesmo biossensor em solução contendo $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorogênico em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0). Os valores obtidos para as correntes de pico resultantes foram calculados e o desvio padrão relativo encontrado foi de 4,30%.

A reprodutibilidade da resposta de corrente de pico resultante de três biossensores preparados independentemente foi investigada em solução contendo $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorogênico em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0). O desvio padrão relativo entre esses dados foi de 1,81%, o que sugere uma eficiente imobilização da PFO no suporte de quitosana.

O biossensor foi estocado à temperatura ambiente e a estabilidade investigada por um período de 150 dias, com medidas realizadas em solução de ácido clorogênico $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. As medidas foram realizadas entre 1-8 dias e nenhuma mudança significativa foi observada durante este período, o que pode se atribuído a eficiente imobilização da enzima no suporte de quitosana.

4.9. ESTUDO DE RECUPERAÇÃO

O estudo de recuperação de ácido clorogênico foi realizado para investigar os possíveis interferentes. Para este estudo foram adicionados em cada amostra, 1,80; 8,65 e 15,0 g L⁻¹ da solução de ácido clorogênico padrão em quatro amostras de cafés usando o biossensor proposto. Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados na Tabela 2, e como pode ser observado o ácido clorogênico recuperado variou de 93,2 a 105,7% evidenciando que não há interferência significativa da matriz da amostra na metodologia proposta.

Tabela 2. Estudo de recuperação de ácido clorogênico em café orgânico (A, B) e descafeinado (C, D).

| Amostra | Ácido clorogênico (g L ⁻¹) | | |
|---------|--|------------|-----------------|
| | Adicionado | Recuperado | Recuperação (%) |
| A | 1,80 | 1,72 | 95,55 |
| | 8,65 | 8,92 | 103,12 |
| | 15,00 | 14,88 | 99,20 |
| B | 1,80 | 1,82 | 101,11 |
| | 8,65 | 8,80 | 101,73 |
| | 15,00 | 14,81 | 98,73 |
| C | 1,80 | 1,75 | 97,22 |
| | 8,65 | 8,06 | 93,20 |
| | 15,00 | 15,36 | 102,40 |
| D | 1,80 | 1,90 | 105,70 |
| | 8,65 | 8,59 | 99,31 |
| | 15,00 | 15,32 | 102,13 |

4.10. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO EM CAFÉ

A fim de avaliar a aplicabilidade do biossensor proposto determinou-se o teor de ácido clorogênico em amostras de café orgânico (A, B) e descafeinado (C, D). Estes resultados foram comparados com os obtidos usando a técnica de eletroforese capilar, como podem ser observados na Tabela 3.

Para comparação dos resultados obtidos usando os diferentes procedimentos foram aplicados os testes t e F. O valor tabelado de t para 6 graus de liberdade é de 2,447 com intervalo de confiança de 95%. Uma vez que os valores $t_{\text{calculado}}$ são menores que o t_{tabelado} não há diferença significativa nas determinações, exceto para a amostra D, possivelmente devido a erros operacionais.

Os valores de $F_{\text{calculado}}$ são menores que o valor do $F_{\text{tabelado}}(4) = 9,28$ ($\alpha = 0,05$), portanto não há significância na diferença entre as duas precisões, demonstrando que estes métodos são estatisticamente iguais.

Os resultados das determinações estão em concordância, indicando a viabilidade de utilização do biossensor na determinação de ácido clorogênico nessas amostras.

Tabela 3. Determinação de ácido clorogênico (g L^{-1}) em amostras de café orgânico (A, B) e descafeinado (C, D).

| Amostra | Ácido clorogênio (g L^{-1}) | | |
|---------|--|-----------------------------|---------------------|
| | Eletroforese capilar | Biossensor* | Erro relativo (Er%) |
| | | $X = 0,71 \pm 0,02$ | |
| A | $0,71 \pm 0,01$ | $t_c = 0,0$ $F_c = 4,0$ | 0,0 |
| | | $X = 0,62 \pm 0,02$ | |
| B | $0,60 \pm 0,02$ | $t_c = 1,41$ $F_c = 1,0$ | + 3,67 |
| | | $X = 0,99 \pm 0,01$ | |
| C | $0,97 \pm 0,02$ | $t_c = 1,79$ $F_c = 4,0$ | + 2,06 |
| | | $X = 0,96 \pm 0,01$ | |
| D | $1,01 \pm 0,02$ | $t_c = 4,48$ $F_c = 4,0$ | - 4,95 |

*n=4; X = média \pm desvio padrão; t_c = valor t calculado e t_T = valor teórico (2,45) no intervalo de confiança de 95%; F_c = valor F calculado, F_t = valor tabelado (9,28) no intervalo de confiança de 95%; Er= biossensor *versus* eletroforese capilar.

5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que os objetivos propostos de implementação do biossensor contendo o líquido iônico Ir-BMI.PF₆ e enzima polifenol oxidase imobilizada em quitosana para determinação de ácido clorogênico foram atingidos.

A obtenção da enzima polifenol oxidase da fruta do conde apresentou um procedimento simples, de baixo custo e eficiente, além de apresentar atividade enzimática superior a outros tecidos vegetais. (LUPETTI et al., 2003; VIEIRA e FATIBELLO-FILHO, 1998).

A quitosana, material utilizado como suporte para imobilização da polifenol oxidase, foi facilmente reticulada ionicamente com oxalato apresentando um suporte adequado para imobilização da enzima garantindo maior estabilidade ao biossensor.

O líquido iônico BMI.PF₆ contendo nanopartículas de irídio foi utilizado com sucesso na construção do biossensor atuando não somente como aglutinante mais também facilitando a transferência de elétrons na superfície do biossensor aumentando consideravelmente sua resposta analítica.

O biossensor proposto possui sensibilidade adequada ($9,15 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) para a determinação de ácido clorogênico em amostras de café apresentando boa linearidade (R=0,9996) em intervalo de concentrações de $3,48 \times 10^{-6}$ a $4,95 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Os testes de repetibilidade ($n=7$) e reprodutibilidade ($n=3$) contendo $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorogênico em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) foram satisfatórios, apresentando um desvio padrão relativo de 4,30% e 1,81%, respectivamente. O tempo de vida do biossensor investigado por 150 dias manteve-se estável durante todo o período confirmando a eficiência da imobilização da enzima no suporte de quitosana.

Com a otimização do biossensor desenvolvido pode-se quantificar com sucesso o teor de ácido clorogênico presente em amostras de café orgânico e descafeinado estando em concordância com o método comparativo de eletroforese capilar. O estudo de recuperação comprovou que o método empregado utilizando o biossensor proposto não sofre influência significativa da matriz.

Além disso, a utilização do biossensor apresentou facilidade de construção e regeneração da superfície do eletrodo, sendo uma metodologia analítica simples e adequada para determinação de ácido clorogênico em café.

6. REFERÊNCIAS

ALTUN, G. D.; CETINUS, S. A. **Immobilization of pepsin on chitosan beads**. *Food Chem.*, 100, 964–971, 2007.

ANDERSON, J. L.; ARMSTRONG, D. W.; WEI, G.-T. **Ionic liquids in analytical chemistry**. *Anal. Chem.*, 78, 2893-2902, 2006.

ANDJELKOVIC, M.; CAMP, J. V.; MEULENAER, B.; DEPAEMELAERE, G.; SOCACIU, C.; VERLOO, M.; VERHE, R. **Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups**. *Food Chem.*, 98, 23–31, 2006.

BABU, B. R.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. **Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenoloxidase using aqueous two-phase system**. *Chem. Eng. Process.*, 47, 83–89, 2008.

BARON, R.; ZAYATS, M.; WILLNER, I. **Dopamine-, L-DOPA-, Adrenaline-, and Noradrenaline-Induced Growth of Au Nanoparticles: Assays for the Detection of Neurotransmitters and of Tyrosinase Activity**. *Anal. Chem.*, 77, 1566-1571, 2005.

BENNETT, M. D.; LEO, D. J. **Ionic liquids as stable solvents for ionic polymer transducers**. *Sens. Actuators, A*, 115, 79–90, 2004.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5.ed. New York: W. H. Freeman, 2002. 974p.

BIZET, K.; GABRIELLI, C.; PERROT, H. **Biosensors based on piezoelectric transducers**. *Analisis*, 7, 609-616, 1999.

CAMPÀS, M., CARPENTIER, R.; ROUILLON, R. **Plant tissue-and photosynthesis-based biosensors**. *Biotechnol. Adv.*, 26, 370–378, 2008.

CARVALHO, M. L.; SANTHIAGO, M.; PERALTA, R. A.; NEVES, A.; MICKE, G. A.; VIEIRA, I. C. **Determination of chlorogenic acid in coffee using**

a biomimetic sensor based on a new tetranuclear copper(II) complex. *Talanta*, 77, 394–399, 2008.

CONSORTI, C. S.; SOUZA, R. F.; DUPONT, J.; SUAREZ, P. A. Z. **Líquidos iônicos contendo o cátion dialquilimidazólio: estrutura, propriedades físico-químicas e comportamento em solução.** *Quim. Nova*, 24, 830-837, 2001.

COSNIER, S. **Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review.** *Biosens. Bioelectron.*, 14, 443–456, 1999.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros.** *Quim. Nova*, 27, 623-630, 2004.

DASH, P.; DEHM, N. A.; SCOTT, R. W. J. **Bimetallic PdAu nanoparticles as hydrogenation catalysts in imidazolium ionic liquids.** *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 286, 114–119, 2008.

DECKER, H.; SCHWEIKARDT, T.; NILLIUS, D.; SALZBRUNN, U.; JAENICKE, E.; TUCZEK, F. **Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases.** *Gene*, 398, 183–191, 2007.

D'ORAZIO, P. **Biosensors in clinical chemistry.** *Clin. Chim. Acta*, 334, 41–69, 2003.

DUPONT, J.; SUAREZ, P. A. Z. **Physico-chemical processes in imidazolium ionic liquids.** *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8, 2441–2452, 2006.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. **Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review.** *Enzyme Microb. Technol.* 31, 907–931, 2002.

FARRÉ, M.; KANTIANI, L.; PÉREZ, S.; BARCELÓ, D. **Sensors and biosensors in support of EU Directives.** *Trends Anal. Chem.* (2008), doi:10.1016/j.trac.2008.09.018.

FATIBELL-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. **Biossensores**. Quím. Nova, 15, 28-39, 1992.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA I. C. **Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática**. Quím. Nova, 25, 455-464, 2002.

FERNANDES, S. C.; OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FATIBELLO-FILHO, O.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. **Biosensor based on laccase immobilized on microspheres of chitosan crosslinked with tripolyphosphate**. Sens. Actuators, B, 133, 202-207, 2008.

FRANK, O.; BLUMBERG, S.; KRUMPEL, G.; HOFMANN, T. **Structure determination of 3-O-Caffeoyl-*epi*- γ -quinide, an orphan bitter lactone in roasted coffee**. J. Agric. Food Chem., 56, 9581-9585, 2008.

FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. **Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices**. J. Braz. Chem. Soc., 13, 456-462, 2002.

FU, Y.; ZHANG, K.; WANG, N.; DU, J. **Effects of aqueous chlorine dioxide treatment on polyphenol oxidases from golden delicious apple**. LWT- Food Sci. Technol., 40, 1362-1368, 2007.

FUJIOKA, K.; SHIBAMOTO, T. **Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees**. Food Chem., 106, 217-221, 2008.

GOMES, S. A. A. S.; REBELO, M. J. F. **A new laccase biosensor for polyphenols determination**. Sensors, 3, 166-175, 2003.

GUILBAULT, G. G. **Analytical uses of immobilized enzymes**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1984. 453p.

GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. **Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman**. Carbohydr. Res., 341, 744-756, 2006.

GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. **Controlled-release formulations for hydroxy urea and rifampicin using polyphosphate- anion-crosslinked chitosan microspheres.** J. Appl. Polym. Sci., 104, 1942–1956, 2007.

HU, F.; DENG, C.; LIU, Y.; ZHANG, X. **Quantitative determination of chlorogenic acid in *Honeysuckle* using microwave-assisted extraction followed by nano-LC-ESI mass spectrometry.** Talanta, 77, 1579-1583, 2009.

IMM, J.-Y.; KIM, S.-C. **Convenient partial purification of polyphenol oxidase from apple skin by cationic reversed micellar extraction.** Food Chem., 113, 302–306, 2009.

JAHNZ, U.; SCHUBERT, M.; BAARS-HIBBE, H.; VORLOP, K.-D. **Process for producing the potential food ingredient DFA III from inulin: screening, genetic engineering, fermentation and immobilization of inulase II.** Int. J. Pharm., 256, 199–206, 2003.

JIA, X.; TAN, L.; XIE, Q.; ZHANG, Y.; YAO, S. **Quartz crystal microbalance and electrochemical cytosensing on a chitosan/multiwalled carbon nanotubes/Au electrode,** Sens. Actuators, B, 134, 273–280, 2008.

KARA, A.; OSMAN, B.; YAVUZ, H.; BESIRLI, N.; DENIZLI, A. **Immobilization of α -amylase on Cu^{2+} chelated poly(ethylene glycol dimethacrylate-*n*-vinyl imidazole) matrix via adsorption.** React. Funct. Polym., 62, 61–68, 2005.

KIM, J.; GRATE, J.; WANG, P. **Nanostructures for enzyme stabilization.** Chem. Eng. Sci., 61, 1017–1026, 2006.

KLOTZBACH, T. L.; WATT, M.; ANSARI, Y.; MINTEER, S. D. **Improving the microenvironment for enzyme immobilization at electrodes by hydrophobically modifying chitosan and Nafion® polymers.** J. Membr. Sci., 311, 81–88, 2008.

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

KRIZMAN, M.; BARICEVIC, D.; PROSEK, M. **Determination of phenolic compounds in fennel by HPLC and HPLC–MS using a monolithic reversed-phase column.** J. Pharm. Biomed. Anal., 43, 481–485, 2007.

KUMAR, V. B. A.; MOHAN, T. C. K.; MURUGAN, K. **Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra L.*).** Food Chem., 110, 328–333, 2008.

LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; BESSON, C.; SCALBERT, A. **Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats.** J. Nutr., 136, 1192–1197, 2006.

LEE, C.-H.; WANG, S.-C.; YUAN, C.-J.; WEN, M.-F.; CHANG, K.-S. **Comparison of amperometric biosensors fabricated by palladium sputtering, palladium electrodeposition and Nafion/carbon nanotube casting on screen-printed carbon electrodes.** Biosens. Bioelectron., 22, 877–884, 2007.

LEE, J.-H.; PARK, J. H.; KIM, Y. S.; HAN, Y. **Chlorogenic acid, a polyphenolic compound, treats mice with septic arthritis caused by *Candida albicans*.** Int. Immunopharmacol., 8, 1681–1685, 2008.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica.** 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.

LEI, Y.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. **Microbial biosensors.** Anal. Chim. Acta, 568, 200–210, 2006.

LIMA, E. D. P. A.; PASTORE, G. M.; LIMA, C. A. **Purificação da enzima polifenoloxidase (PFO) de polpa de pinha (*Annona Squamosa L.*) madura.** Ciência e tecnologia de alimentos, 21, 98–104, 2001.

LIU, Q.; CAI, W.; SHAO, X. **Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration.** Talanta, 77, 679–683, 2008.

LIU, L.; SUN, Y.; LAURA, T.; LIANG, X.; YE, H.; ZENG, X. **Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng.** Food Chem., 112, 35–41, 2009.

LUCZAK, J.; HUPKA, J.; THÖMING, J.; JUNGnickel, C. **Self-organization of imidazolium ionic liquids in aqueous solution.** *Colloids Surf., A*, 329, 125–133, 2008.

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*, 26, 197-201, 2003.

MALEKI, N.; SAFAVI, A., TAJABADI, F. **High-Performance carbon composite electrode based on an ionic liquid as a binder.** *Anal. Chem.* 78, 3820-3826, 2006.

MARÍN-MARTINEZ, R.; VELOZ-GARCÍA, R.; VELOZ-RODRÍGUEZ, R.; GUZMÁN-MALDONADO, S. H.; LOARCA-PINA, G.; CARDADOR-MARTINEZ, A.; GUEVARA-OLVERA, L.; MIRANDA-LÓPEZ, R.; TORRES-PACHECO, I.; PÉREZ, C. P.; HERRERA-HERNÁNDEZ, G.; VILLASEÑOR-ORTEGA, F.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.; GUEVARA-GONZALEZ, R. G. **Antimutagenic and antioxidant activities of quebracho phenolics (*Schinopsis balansae*) recovered from tannery wastewaters.** *Bioresour. Technol.*, 100, 434–439, 2009.

MARQUES, V.; FARAH, A.; **Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions.** *Food Chem.*, 113, 1370–1376, 2009.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.** *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 1451-1463, 2007.

MATTILA, P.; HELLSTROM, J. **Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products.** *J. Food Composition Anal.*, 20, 152–160, 2007.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. **Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries.** *Food Chem.*, 77, 237–256, 2002.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. **Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation.** *Talanta*, 72, 335–348, 2007.

MIKKELSEN, S. R.; CORTÓN, E. **Bioanalytical Chemistry**. New Jersey: John Wiley and Sons, 2004. 375p.

MOCCELINI, S. K.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. **Biosensors based on bean sprout homogenate immobilized in chitosan microspheres and silica for determination of chlorogenic acid**. *Enzyme Microb. Technol.*, 43, 381–387, 2008.

NILLIUS, D.; JAENICKE, E.; DECKER, H. **Switch between tyrosinase and catecholoxidase activity of scorpion hemocyanin by allosteric effectors**. *FEBS Lett.*, 582, 749–754, 2008.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. **Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin**. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 366–372, 2006 A.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. **Immobilization procedures for the development of a biosensor for determination of hydroquinone using chitosan and gilo (*Solanum gilo*)**. *Enzyme Microb. Technol.*, 38, 449–456, 2006 B.

ONÉSIPPE, C.; LAGERGE, S. **Studies of the association of chitosan and alkylated chitosan with oppositely charged sodium dodecyl sulfate**. *Colloids Surf., A*, 330, 201–20, 2008.

PATACAS, R. C. **Desenvolvimento, Caracterização e Optimização de um biosensor amperométrico para a determinação de Nitrato baseado em microinterfaces gelificadas**. Porto: FCUP, 2007. Dissertação (Mestrado em Química), Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2007.

PAULIUKAITE, R.; DOHERTY, A. P.; MURNAGHAN, K. D.; BRETT, C. M. A. **Characterisation and application of carbon film electrodes in room temperature ionic liquid media**. *J. Electroanal. Chem.*, 616, 14–26, 2008.

PERALTA, R. A.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; DOS ANJOS, A.; XAVIER, F. R.; SZPOGANICZ, B.; TERENCEZI, H.; DE OLIVEIRA, M. C. B.; CASTELLANO, E.; FRIEDERMANN, G. R.; MANGRICH, A. S.; NOVAK, M. A. **New unsymmetric dinuclear CuII CuII complexes and their**

relevance to copper(II) containing metalloenzymes and DNA cleavage. J. Inorg. Biochem., 100, 992–1004, 2006.

PEREIRA, E. B.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. **Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions.** Braz. J. Chem. Eng., 20, 343 - 355, 2003.

REDEL, E.; KRÄMER, J.; THOMANN, R.; JANIÁK, C. **Synthesis of Co, Rh and Ir nanoparticles from metal carbonyls in ionic liquids and their use as biphasic liquid–liquid hydrogenation nanocatalysts for cyclohexene.** J. Organomet. Chem. (2008), doi: 10.1016/j.jorganchem.2008.09.050.

RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. **Immunossensor amperométrico.** Quim. Nova, 25, 316-320, 2002.

SAFAVI, A.; MALEKI, N.; MORADLOU, O.; TAJABADI, F. **Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using carbon ionic liquid electrode.** Anal. Biochem., 359, 224–229, 2006.

SAFRA, J.; POSPISILOVA, M.; HONEGR, J.; SPILKOV, J. **Determination of selected antioxidants in *Melissae herba* by isotachopheresis and capillary zone electrophoresis in the column-coupling configuration.** J. Chromatogr., A, 1171, 124–132, 2007.

SANZ, V. C.; MENA, M. L.; GONZALEZ-CORTES, A.; YANEZ-SEDENO, P.; PINGARRON, J. M. **Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes. Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines.** Anal. Chim. Acta, 528, 1–8, 2005.

SARMA, A. K.; VATSYAYAN, P.; GOSWAMI, P.; MINTER, S. D. **Recent advances in material science for developing enzyme electrodes.** Biosens. Bioelectron. (2008), doi:10.1016/j.bios.2008.09.026.

SCHEEREN, C. W.; MACHADO, G.; TEIXEIRA, S. R.; MORAIS, J.; DOMINGOS, J. B.; DUPONT, J. **Synthesis and Characterization of Pt(0) Nanoparticles in Imidazolium Ionic Liquids.** J. Phys. Chem. B, 110, 13011-13020, 2006

SHARMA, K.; BARI, S. S.; SINGH, H. P. **Biotransformation of tea catechins into theaflavins with immobilized polyphenol oxidase.** J. Mol. Catal. B: Enzym., 56, 253-258, 2009.

SHEN, J.; DUDIK, L.; LIU, C.-C. **An iridium nanoparticles dispersed carbon based thick film electrochemical biosensor and its application for a single use, disposable glucose biosensor.** Sens. Actuators, B, 125, 106-113, 2007.

SUH, J.-K. F.; MATTHEW, H. W. T. **Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review.** Biomaterials, 21, 2589-2598, 2000.

TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. **Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors.** Mater. Sci. Eng., C, 28, 1530-1543, 2008.

VAHER, M.; KOEL, M. **Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis.** J. Chromatogr. A, 990, 225-230, 2003.

VARMA, A. J.; DESHPANDE, S. V.; KENNEDY, J. F. **Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review.** Carbohydr. Polym., 55, 77-93, 2004.

VELASCO-GARCIA, M. N.; MOTTRAM, T. **Biosensor Technology addressing Agricultural Problems.** Biosystems Eng., 84, 1-12, 2003.

VENKATACHALAM, K.; ARZUAGA, X.; CHOPRA, N.; GAVALAS, V. G.; XU, J.; BHATTACHARYYA, D.; HENNIG, B.; BACHAS, L. G. **Reductive dechlorination of 3,3-,4,4--tetrachlorobiphenyl (PCB77) using palladium or palladium/iron nanoparticles and assessment of the reduction in toxic potency in vascular endothelial cells.** J. Hazardous Mater., 159, 483-491, 2008.

VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. **Flow injection spectrophotometric determination of total phenols using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as enzymatic source.** Anal. Chim. Acta, 366, 111-118, 1998.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. **Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical**

and molecular biological approaches. J. Mol. Catal. B: Enzym., 9, 113-148, 2000.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**, 2.ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1995. 1360p.

WANG, S. F.; XIONG, H. Y.; ZENG, Q. X. **Design of carbon paste biosensors based on the mixture of ionic liquid and paraffin oil as a binder for high performance and stabilization.** Electrochem. Commun., 9, 807-812, 2007 A.

WANG, X.; WANG, J. L; YANG, N. **Chemiluminescent determination of chlorogenic acid in fruits.** Food Chem., 102, 422-426, 2007 B.

WANG, X.-K.; HE, Y.-Z.; QIAN, L.-L. **Determination of polyphenol components in herbal medicines by micellar electrokinetic capillary chromatography with Tween 20.** Talanta, 74, 1-6, 2007 C.

WEI, S.; DANDAN, W.; RUIFANG, G.; KUI, J. **Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin in sodium alginate film on a BMIMPF₆ modified carbon paste electrode.** Electrochem. Commun., 9, 1159-1164, 2007.

WEI, D.; IVASKA, A. **Applications of ionic liquids in electrochemical sensors.** Anal. Chim. Acta, 607, 126-135, 2008.

YEN, M.-T.; YANG, J.-H.; MAU, J.-L. **Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells.** Carbohydr. Polym., 75, 15-21, 2009.

ZAMORANO, J.-P.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, O.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. **Characterisation and tissue distribution of polyphenol oxidase of deep water.** Food Chem., 112, 104-111, 2009.

ZHANG, L.; KOSARAJU, S. L. **Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants.** European Polymer J., 43, 2956-2966, 2007.

<http://www.jaist.ac.jp/~yokoyama/biosensor.html> (Acessado em 26/11/2008).

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>. (Acessado em 27/11/2008).

<http://www.simbiotica.org/composicaoquimicacelula.htm>. (Acessado em 27/11/2008).

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Michaelis-Menten_saturation_curve_of_an_enzyme_reaction.svg (Acessado em 26/11/2008).

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/sugil/tyrc.JPG> (Acessado em 27/11/2008).