

Universidade Federal de Itajubá
Programa de Pós-Graduação em Materiais para
Engenharia

Reginaldo Aparecido Ferreira

Biossensores Baseados em Filmes Automontados Contendo
Tirosinase para a Detecção de Compostos Fenólicos

Dissertação de Mestrado

Itajubá, fevereiro 2012

Universidade Federal de Itajubá
Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia

Reginaldo Aparecido Ferreira

**Biossensores Baseados em Filmes Automontados Contendo
Tirosinase para a Detecção de Compostos Fenólicos**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Materiais para Engenharia como parte dos requisitos para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências em Materiais para
Engenharia.**

Área de concentração: Não Metais

Orientador: Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz – UNIFEI

**Fevereiro de 2012
Itajubá - MG**

A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO NÃO ESTÁ AUTORIZADA PELO PERÍODO DE 5 (CINCO) ANOS.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Mauá –
Bibliotecária Jacqueline Rodrigues de Oliveira Balducci- CRB_6/1698

F382b

Ferreira, Reginaldo Aparecido.

Biossensores Baseados em Filmes Automontados Contendo
Tiosinase para Detecção de Compostos Fenólicos / por Reginaldo
Aparecido Ferreira. -- Itajubá, (MG) : [s.n.], 2012.

84 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Antonio Alencar de Queiroz.
Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá.

1. Biossensor. 2. Tiosinase. 3. Polifenoloxidase. 4. Extrato Bruto.
5. Automontagem. I. Queiroz, Álvaro Antonio Alencar de, orient. II.
Universidade Federal de Itajubá. IV. Título.

*Dedico essa dissertação a meus pais: José Ferreira da Silva e
Maria Belarmina da Silva pelo apoio, amor, carinho e incentivo!
E à memória de minhas avós: Margarida e Divina.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus nosso criador, por me amparar em momentos difíceis e por me dar força interior para superar as dificuldades.

Às minhas avós Margarida e Divina (*in memoriam*) que sempre me deram muito carinho, amor e incentivo.

Ao meu pai Zé Cabrito, uma pessoa fenomenal, exemplo de integridade, que sempre incentivou e acreditou em mim.

À minha mãe Maria, exemplo de serenidade, paciência e fé. “Sem a senhora nada teria dado certo!”

Aos meus irmãos, Reinaldo, Gerinho e Geane, pelo carinho e apoio.

À minha tia Maura pelo incentivo, força desde a infância.

Ao professor Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz. Obrigado pela orientação acadêmica, paciência, conselhos e por dividir essa jornada comigo.

À professora Dr^a. Daniela Sachs pelos conselhos e “puxões de orelha”.

À professora Dr^a. Maria Helena pelo incentivo.

A todos os professores e colegas da Pós - Graduação em Materiais para Engenharia.

Às secretárias da PRPPG Magda, Cláudia e Maria Auta pelo excelente serviço prestado e pelo carinho no atendimento.

Aos amigos da rep. JEDI em especial o Thiago e Esmeraldo pelos momentos de parceria e diversão. E aos sempre JEDI, Robert e Fabiana.

Ao amigo Nirton pela força, ajuda e oportunidade da utilização do laboratório do grupo de Polímeros na USP – São Carlos.

Às grandes amigas Vanis (V.L.) e Ciça pelos conselhos, apoio e momentos divertidos. Vocês foram fundamentais!

Aos amigos Lucimara, Mariana (BH), Fabinho, Simone, Nicole, Ana Lúcia e Luciana Botezelli, pelo apoio e amizade.

Aos amigos da rep. Nego Téia de São Carlos: Marcelo Vivas, Edson, Alfredo e os agregados: Ângelo e PH, pela acolhida, amizade, conselhos e momentos de descontração.

Ao André Brisolari do Grupo de Polímeros Bernhard Gross do IFSC (*in memoriam*) pela ajuda na preparação da enzima, pela paciência e amizade. "Que Deus o guarde em seus braços".

À Valquiria do Grupo de Polímeros Bernhard Gross do IFSC, pela ajuda na preparação da enzima.

Ao professor Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães pela oportunidade oferecida da realização dos experimentos no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC – USP)

À Dr^a. Débora Balogh e à professora Dr^a Débora Gonçalves pela utilização do laboratório de Polímeros do Grupo Bernhard Gross do IFSC

A CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta e indireta pela realização do trabalho.

*“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
acreditar nos sonhos que se tem
ou que os seus planos nunca vão dar certo
ou que você nunca vai ser alguém...”*

Renato Russo

RESUMO

REGINALDO, A. F. *Biossensores Baseados em Filmes Automontados Contendo Tirosinase para a Detecção de Compostos Fenólicos*. 2012. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciências em Materiais para Engenharia) - Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia, Universidade Federal de Itajubá. Itajubá, 2012.

Neste trabalho a enzima tirosinase (polifenoloxidase), extraída do abacate, foi imobilizada via automontagem “camada por camada” (LbL, *layer by layer*) em substratos de vidro recobertos com óxido de índio dopado com estanho (ITO, *indium tin-doped oxide*) para aplicações em biossensores potenciométricos com o objetivo específico de se obter biossensores para a detecção de compostos fenólicos. O dendrímero poli(propileno imina) (PPID) foi utilizado como contra íon no processo de automontagem uma vez que a macromolécula apresenta uma estrutura altamente porosa e grupos funcionais adequados para a imobilização de enzimas. O extrato bruto de tirosinase foi caracterizado quanto à sua cinética apresentando uma constante de Michaelis-Menten (K_M) igual a 5,14 mM. O biossensor obtido apresentou sensibilidade da ordem de 1 – 5mM e 5 – 50 μ M, para amostras de monofenol e catecol, respectivamente. Os resultados encontrados mostraram que é possível a obtenção de biossensores eficientes e de baixo custo a partir do uso da tirosinase na forma de extrato bruto, viabilizando o uso desses biossensores em diversas aplicações de interesse industrial e clínico, tais como a análise e monitoramento de fenóis em efluentes provenientes da indústria farmoquímica, na água, em vinhos e no solo.

Palavras chave: Biossensor. Tirosinase. Polifenoloxidase. Extrato Bruto. Automontagem. Dendrímeros. Poli(propileno imina).

ABSTRACT

REGINALDO, A. F. *Biossensores Baseados em Filmes Automontados Contendo Tirosinase para a Detecção de Compostos Fenólicos*. 2012. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciências em Materiais para Engenharia) - Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia, Universidade Federal de Itajubá. Itajubá, 2012.

In this work the enzyme tyrosinase (polyphenol oxidase) extracted from avocado fruit was immobilized via layer by layer technique onto indium tin-doped oxide (ITO) glass-coated substrates for applications as a potentiometric biosensor for detection of phenolic compounds. The poly (propylene imine) (PPID) dendrimer was used as counter ion in the self-assembly process due to their highly porous structure and suitable functional groups for enzyme immobilization. The crude extract of tyrosinase was properly characterized presenting a Michaelis-Menten constant (K_M) of 5,14 mM. After the immobilization of crude tyrosinase in LBL films, it was possible to detect standard samples of monophenol and catechol in the range of 1 - 5 mM and 5 - 50 μ M, respectively. The results showed that it is possible to obtain efficient and low cost biosensors using tyrosinase in the crude extract form, opening a way for the use of biosensors in several applications, such as analysis and monitoring of phenols in the effluent from pharmaceutical and pharmonochemical industry, wine and in the soil.

Keywords: Biosensor. Tyrosinase. Polyfenoloxidase. Crude extracte. Self-assembly. Dendrimers. Poly(Propylene imine)

Sumário

1	Introdução	19
1.1	Proposta da dissertação	22
2	Os Biossensores	25
2.1	Biossensores potenciométricos.....	26
3	A técnica LBL de automontagem	31
3.1	Biossensores baseados em filmes LbL.....	33
3.2	O Dendrímero usado filmes LbL.....	33
4	As enzimas	37
4.1	Os modelos da ação enzimática	38
4.2	Cinética enzimática	40
4.3	A Tirosinase.....	43
5	Materiais e Métodos	47
5.1	O substrato do ITO.....	47
5.2	Síntese e caracterização do dendrímero PPID	48
5.3	Obtenção e caracterização do extrato bruto de tirosinase	51
5.4	Crescimento dos filmes PPID/Tirosinase	52
5.5	Configuração do biossensor	52
6	Resultados e Discussão	55
6.1	Caracterização do dendrímero PPID	55
6.2	Caracterização do extrato bruto de tirosinase	59
6.3	ITO como sensor de pH.....	62
6.4	Crescimento dos filmes automontados.....	64
6.5	Dispositivo biossensor de fenol e catecol	66
6.5.1	Estudo do número de bicamas	66
6.5.2	Sensibilidade ao pH dos filmes de ITO funcionalizados com PPID/Tirosinase	67
6.5.3	Análise do biossensor	70
7	Conclusões finais e perspectivas	73
	Referências.....	75

1 INTRODUÇÃO

Fenóis e seus derivados, como clorofenóis e compostos aromáticos relacionados, possuem alta toxicidade para o ser humano (1). Estes compostos estão presentes em efluentes industriais oriundos das atividades de produção de plásticos, corantes, tintas, drogas, antioxidantes, polímeros sintéticos, resinas, pesticidas, detergentes, desinfetantes, refinaria de óleo e principalmente de papel e celulose (1). Os compostos fenólicos também estão presentes na natureza, como por exemplo, em componentes naturais da madeira (lignina e tanino) e são responsáveis pelas propriedades organolépticas e cores de muitas frutas e flores. Assim, a qualidade dos alimentos pode estar relacionada com a presença de substâncias fenólicas em sua composição (2). Esses compostos estão presentes também em tinturas capilares, desinfetantes, e como intermediários de outros medicamentos (3).

Pequenas concentrações de compostos fenólicos afetam o gosto e o odor de águas potáveis e também peixes. Muitos desses compostos possuem efeitos tóxicos, pois penetram facilmente na pele e membranas celulares, sendo que a exposição prolongada a doses consideráveis de compostos fenólicos pode causar danos gastrointestinais graves, levando os seres humanos e outros mamíferos à morte, sendo a dose letal (DL) estimada em 70 mg/kg para humanos (4). Observa-se ainda, a aplicação de altas concentrações fenólicas à pele pode causar severas queimaduras (5).

Diante do exposto acima, verifica-se a necessidade de monitoramento e análise contínua dos compostos fenólicos, principalmente no que tange os inúmeros efluentes industriais descarregados em recursos hídricos. O tempo e o custo envolvidos com a detecção

de poluentes ambientais tais como o fenol e seus derivados, como, por exemplo, aquisição e preparação da amostra e análise de laboratório, tem imposto limitações no número de amostras que podem ser analisadas. A maioria das análises tanto de fenol como de espécies fenólicas têm sido realizadas, principalmente, por meio de métodos espectrofotométricos e cromatográficos (cromatografia gasosa com ionização em chama ou acoplada com espectrometria de massa; ou ainda, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (6, 7). Essas técnicas, apesar de eficazes, ainda são caras, lentas e ainda necessitam de pessoal treinado para o seu correto procedimento.

A limitação no número das análises devido ao seu custo elevado tem criado uma demanda por tecnologias automatizadas que possibilitem um aumento no número de análises no menor intervalo de tempo e com custos acessíveis. Assim, dispositivos analíticos denominados biossensores apresentam-se como técnicas promissoras para essa finalidade. Esses dispositivos possuem como principais características a seletividade, baixo custo operacional, potencial para miniaturização, facilidade de manuseio e portabilidade (8) e são utilizados para a determinação de diversas substâncias, tanto de interesse clínico, como de interesse ambiental (8).

Particularmente, os biossensores eletroquímicos são os mais utilizados pela comunidade científica bem como no mercado farmacêutico por oferecerem alta especificidade, baixo limite de detecção e de baixo custo (9). Esses biossensores utilizam transdutores amperométricos, potenciométricos, condutimétricos ou ainda de efeito de campo para transferir o sinal oriundo de um elemento de reconhecimento biológico (geralmente uma enzima) para o domínio elétrico (9). Assim, um biossensor é constituído de um elemento biológico intimamente imobilizado em um transdutor. Portanto, a imobilização constitui uma etapa fundamental na confecção de um biossensor (10).

Diversos métodos para imobilização enzimática estão presentes na literatura (11) e o método mais adequado é aquele que promove a maior atividade biológica após a imobilização (11).

A utilização de filmes automontados via adsorção física camada por camada ou LbL (do inglês, *layer by layer*) permite a construção de filmes que podem conter materiais biológicos imobilizados preservando ao mesmo tempo sua atividade biológica (12). O rigoroso controle da arquitetura do filme ao nível molecular possibilita a aplicação desses sistemas automontados em biossensores (13, 14). Assim, a técnica LbL parece ser adequada para obtenção de biossensores uma vez que a imobilização enzimática não compromete o sítio ativo do catalisador biológico, pois nenhuma ligação química é necessária, o que confere alta atividade ao biocatalisador (12). Neste contexto, biossensores para a detecção de fenóis podem ser facilmente construídos por adsorção física da enzima tirosinase em plataformas moleculares adequadas. A enzima tirosinase é amplamente utilizada como elemento de reconhecimento biológico na detecção de fenóis, uma vez que essa enzima catalisa tanto monofenóis quanto difenóis (15).

A tirosinase em seu extrato bruto (tirosinase-EB) pode ser utilizada como alternativa à tirosinase pura em biossensores. Neste caso, frutas como abacate e banana são utilizadas como fonte de tirosinase sem purificação, o que reduz significativamente o custo do processo e imobilizada em eletrodos via técnica LbL. Assim, combinando a técnica LbL, transdutores potenciométricos e extrato bruto da tirosinase, biossensores para determinação de compostos fenólicos podem ser construídos de uma forma simples e a baixo custo.

No presente trabalho, a tirosinase foi extraída do abacate e imobilizadas em substratos de vidro recobertos com óxido de índio dopado com estanho (ITO, *indium tin-doped oxide*) em conjunto com o dendrímero poli(propileno imina) (PPID). Os filmes comerciais de ITO apresentam alta sensibilidade às variações de pH. Por outro lado, os

dendrímeros PPID são macromoléculas porosas, que podem atuar como sistemas permeáveis para a difusão de íons H^+ (subproduto formado na catálise de compostos fenólicos) de forma que a geração de prótons *in-situ* altera o potencial do meio reacional.

1.1 PROPOSTA DA DISSERTAÇÃO

O objetivo geral dessa dissertação é a obtenção de um biossensor para a detecção de compostos fenólicos baseado em um dispositivo de efeito de campo sensível à variações de pH. Os objetivos específicos dessa dissertação são:

- I. **Construção de um dispositivo de efeito de campo universal:** construir um dispositivo potenciométrico baseados no conceito de efeito de campo que permita a aquisição rápida e precisa do sinal através de um computador.
- II. **Extração da enzima tirosinase a partir do abacate:** extrair a enzima tirosinase da polpa do abacate e obter a atividade enzimática do extrato bruto a partir da determinação da constante de Michaelis-Menten.
- III. **Fabricação e caracterização de filmes automontados contendo tirosinase:** preparar filmes automontados contendo o extrato bruto de tirosinase e caracterizar o sistema automontado por técnicas espectroscópicas.
- IV. **Aplicação dos filmes automontados como biossensores de fenol e catecol:** Aplicar os filmes automontados como plataformas sensíveis em dispositivos de efeito de campo a fim de se obter novos biossensores para a detecção de fenol e catecol.

Num primeiro momento, filmes comerciais de ITO foram testados como sensor de pH em um dispositivo potenciométrico baseado no conceito de efeito de campo. Após, os

mesmos foram funcionalizados com filmes automontados contendo o extrato bruto de tirosinase e dendrímeros PPID, uma macromolécula porosa altamente funcional. Por fim, o sistema ITO-(PPID/Tirosinase) foi aplicado como biossensor. Os resultados obtidos indicaram que o sistema ITO-(PPID/Tirosinase) é eficiente para a detecção de fenol e catecol.

A dissertação está organizada da seguinte forma: O **Capítulo 2** exibe uma revisão sobre biossensores potenciométricos, principalmente aqueles baseados em dispositivos de efeito de campo, enfatizando sua operação. O **Capítulo 3** descreve a técnica de obtenção de filmes via automontagem camada por camada. No **Capítulo 4** são abordadas as particularidades referentes aos sistemas enzimáticos, enfatizando a cinética de atuação dos biocatalisadores e especificamente da enzima tirosinase. Os materiais e métodos utilizados no trabalho, bem como as técnicas de caracterização e a configuração experimental do dispositivo biossensor são apresentados no **Capítulo 5**. O **Capítulo 6** é destinado aos resultados e discussões da dissertação. Por fim, as conclusões e sugestões para trabalhos futuros são apresentadas no **Capítulo 7**.

2 OS BIOSSENSORES

Um biossensor é um dispositivo analítico no qual o material de origem biológica, tais como enzimas, organelas, parte de tecido animal ou vegetal, microrganismos, antígenos ou anticorpos, entre outros, é imobilizado junto a um transdutor adequado que é capaz de converter uma reação de origem biológica em um sinal apropriado (9). O sinal criado é proporcional à concentração do analito (também conhecido como substrato) a ser determinado. Dessa forma, o biossensor é classificado de acordo com o transdutor utilizado em: eletroquímico (amperométrico, potenciométrico e condutimétrico) (9), óptico (medida de luminescência, fluorescência, etc.) (16) e detector de massa, onde se usa a relação da frequência dos cristais piezoelétricos (17).

Outra classificação possível para os biossensores é aquela que depende do tipo de interação que ocorre entre a substância a ser determinada e o material biológico, sendo classificado como catalítico ou de afinidade química (9). Os biossensores catalíticos são aqueles que possuem como material de reconhecimento biológico as enzimas, organelas, células animais e vegetais (18). Por sua vez, os biossensores de afinidade química são os do tipo que inclui anticorpos, receptores, e ácidos nucleicos (19).

A Figura 2.1 ilustra os componentes básicos de um dispositivo biossensor, onde se têm o biocatalisador (material de reconhecimento biológico) imobilizado. Neste local ocorre a reação bioquímica responsável pela geração do sinal. O sinal é então convertido em um sinal elétrico no transdutor, podendo ser amplificado e então processado.

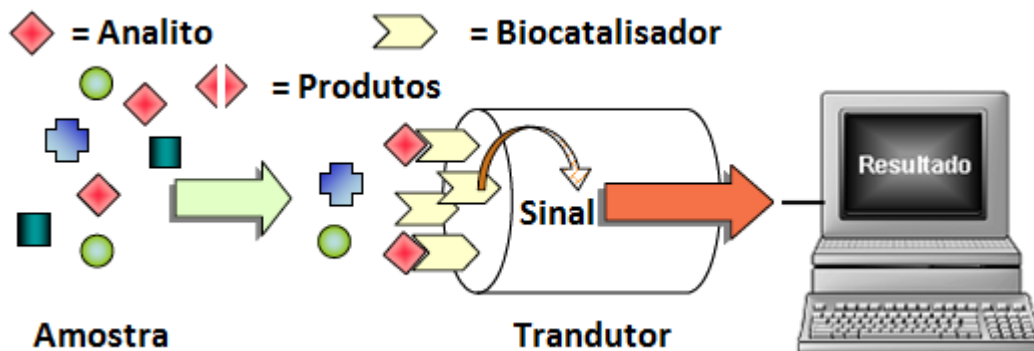


Figura 2.1 - Esquema dos componentes básicos de um biossensor.

2.1 BIOSSENSORES POTENCIOMÉTRICOS

A potenciometria constitui um dos métodos instrumentais mais antigos e utilizados no campo de sensores (20) e biossensores (21). Esta técnica de análise se tornou atraente para muitas aplicações práticas, uma vez que permite a determinação de vários tipos íons e emprega equipamentos de medida de custo relativamente baixo (20).

A definição de biossensores potenciométricos compreende duas características importantes: (i) o componente de reconhecimento biológico como parte integrante do mesmo, (ii) o sinal analítico gerado pelo biossensor é uma diferença de potencial. Portanto, os biossensores potenciométricos são dispositivos que compreendem eletrodos de vidro, sensores baseados na interface metal-óxido ou eletrodos íons-seletivos nos quais estão imobilizados biocatalisadores (21). Nesse tipo de biossensor, a geração de íons provenientes de uma reação de catálise ou afinidade, altera o potencial do meio reacional, criando uma diferença de potencial entre o eletrodo que contem o material biológico e um eletrodo de referência que mantém uma tensão constante (21).

Como já exposto anteriormente em biossensores, uma grandeza física ou química está relacionada direta ou indiretamente com a concentração da substância a qual se deseja determinar (analito). Em biossensores potenciométricos, geralmente o potencial hidrogeniônico (pH) é essa grandeza, uma vez que diversos processos biológicos e bioquímicos dependem do seu valor ou resultam na liberação ou consumo de prótons (21).

Um sistema interessante para determinação do pH trata-se do transistor de efeito de campo sensível a íons (ISFET, do inglês *ion-sensitive field-effect transistor*) (22, 23). Um ISFET é um sensor iônico muito semelhante a um dispositivo MOSFET (transistor de efeito de campo metal-óxido-semicondutor ou do inglês *metal oxide semiconductor field-effect transistor*). A diferença básica entre os dispositivos se refere a não existência do eletrodo metálico de porta (ou *gate*) no ISFET, sendo este substituído por um eletrodo de referência contido em uma solução (24). A Figura 2.2 ilustra a diferença entre os dispositivos.

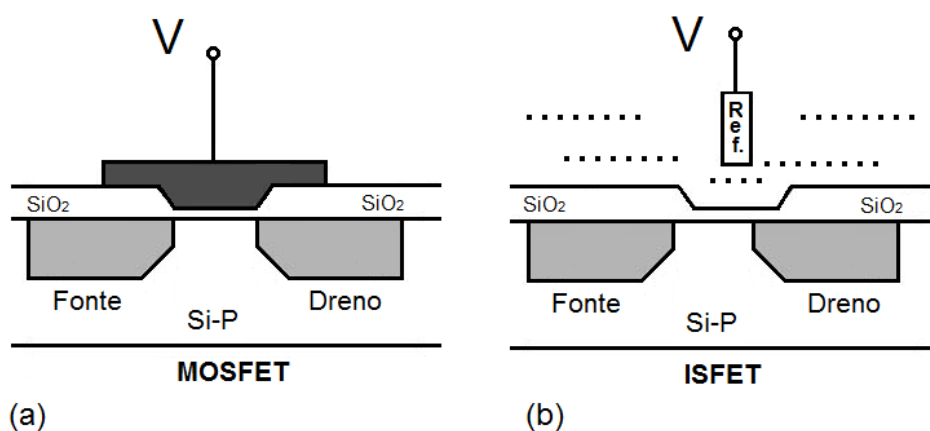


Figura 2.2 – Diagrama esquemático de um MOSFET (a) e de um ISFET (b). Adaptado da referência (24).

A principal vantagem do uso de ISFETs é a sua aplicação como biossensores através de imobilização de enzimas no óxido metálico (25), o que possibilita sua produção em larga escala através de processos de microeletrônica. Em contra partida, a principal desvantagem é a dificuldade de isolamento do FET do meio reacional. Assim, um sistema alternativo foi proposto por Van der Spiegel (26) e posteriormente aprimorado por Chi (27), o transistor de

efeito de campo de porta estendida (EGFET) (27). A princípio, um EGFET é formado por uma membrana quimicamente sensível conectada ao eletrodo porta de um MOSFET comercial (Figura 2.3a). De forma análoga a um ISFET, uma alteração do potencial da solução modula a sinal de saída do MOSFET. A principal vantagem do EGFET é que MOSFET pode ser reaproveitado para a aplicação em sensores ou biossensores descartáveis, uma vez que é necessário construir apenas a membrana sensível (porta estendida) (Figura 2.3b) (28, 29).

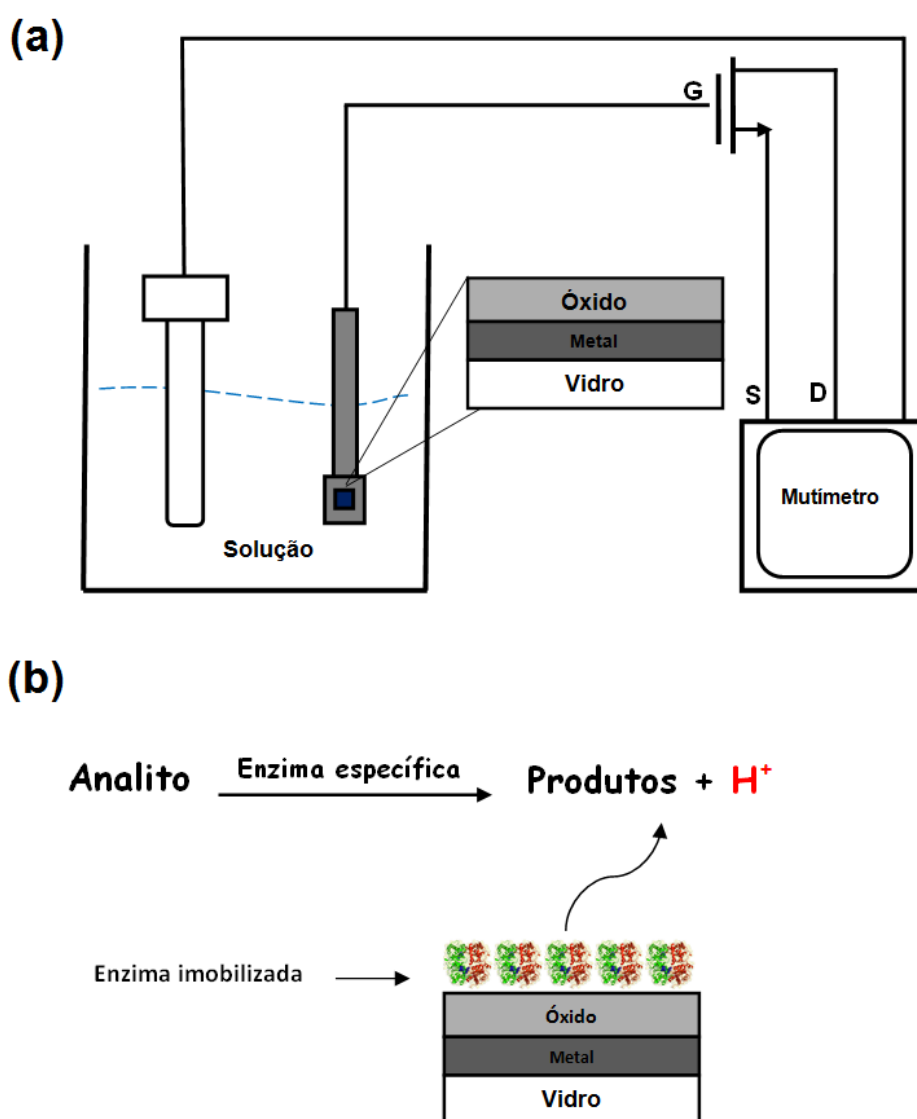


Figura 2.3 – Diagrama esquemático de um dispositivo EGFET. G, S, D representam respectivamente os eletrodos de porta, fonte e dreno de um MOSFET comercial (a). EGFET utilizado como biossensor potenciométrico.(b) uma enzima gera íons H^+ alternando potencial do meio.

A literatura sugere que um EGFET ainda pode ser formado por uma camada sensível conectada a um dispositivo de alta impedância, geralmente, um amplificador operacional (AO) (27) ou ainda amplificador de instrumentação (AI) (30, 31) (Figura 2.4). Contudo essa configuração pode não ser interpretada como um EGFET, uma vez que o eletrodo não está conectado diretamente a um MOSFET, mas basicamente a um circuito de leitura que naturalmente contém MOSFETs. A configuração sugerida pela literatura em questão (27, 30, 31) é, portanto, mais semelhante a um potencial de circuito aberto (OCP, do inglês: *open circuit potential*).

Após experimentar todas as configurações de EGFET sugeridas pela literatura, optou-se nesse trabalho por utilizar uma configuração baseada em um amplificador de instrumentação para evitar o uso de uma fonte adicional de corrente, necessária em medidas dinâmicas em um EGFET à base de MOSFET (27). Ao mesmo tempo, o AI oferece uma maior estabilidade operacional quando comparado como a um AO. Contudo, o sistema será denominado nesse trabalho simplesmente de dispositivo de efeito de campo (FED, *field effect device*).

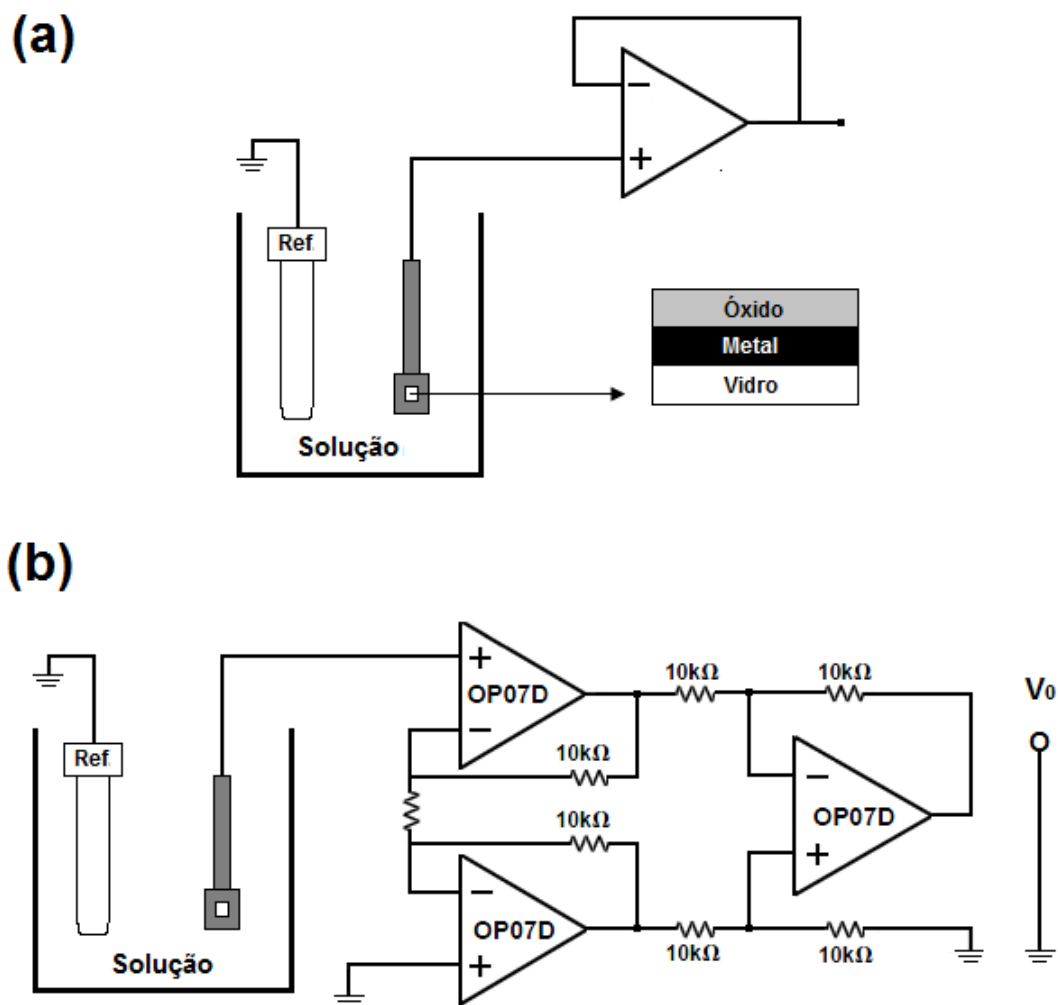


Figura 2.4 – Configuração experimental de um EGFET utilizando um amplificador operacional (a) (26, 27) e um amplificador de instrumentação (b) (30).

3 A TÉCNICA LbL DE AUTOMONTAGEM

A técnica de automontagem por adsorção física, em inglês denominada *layer by layer* (LbL), é muito utilizada para a fabricação de filmes finos (32). É uma técnica simples, que não exige equipamentos sofisticados, sendo essa característica a sua principal vantagem. Através dessa técnica, diferentes materiais podem ser combinados com um rigoroso controle da arquitetura do filme ao nível molecular (32). Até mesmo a imobilização de proteínas ou enzimas é possível via LbL, as quais preservam alta atividade biológica após a imobilização (12, 33).

A técnica LbL por adsorção física já havia sido empregado por Iler e colaboradores na década de 60 (34), contudo, não houve grande repercussão. Ao invés da adsorção química entre as camadas, a técnica iniciada Iler (34) e difundida por Decher, Livov e colaboradores (35-37), baseia-se em interações físicas (eletrostáticas, ligações de hidrogênio e de Van der Walls) de camadas de materiais carregados com cargas de sentido contrário. Dessa forma, podem-se adsorver alternadamente polieletrólitos catiônicos e aniônicos sobre substratos sólidos conforme ilustrado na Figura 3.1. Um substrato sólido carregado, por exemplo, negativamente, é imerso na solução catiônica, de maneira que uma camada do polielectrolyte adsorva em sua superfície invertendo assim o sinal de sua carga. O substrato fica por um tempo determinado em uma solução de lavagem (geralmente em água ultrapura ou solução com o mesmo pH do polieletrólito). Nessa etapa, ocorre a retirada do excesso de material ou de moléculas fracamente absorvidas ao substrato. Em seguida, o substrato é imerso na solução

polianiónica, promovendo a adsorção do poliânion na camada previamente adsorvida de policação. Uma nova etapa de lavagem ocorre agora para o poliânion. Obtém-se assim uma bicamada, sendo que a repetição do processo permite a fabricação de filmes finos compostos por quantas camadas forem desejadas. Vale ressaltar, que etapas intermediárias de secagem podem estar presentes, e geralmente são realizadas com fluxo de gás nitrogênio (N_2) (28).

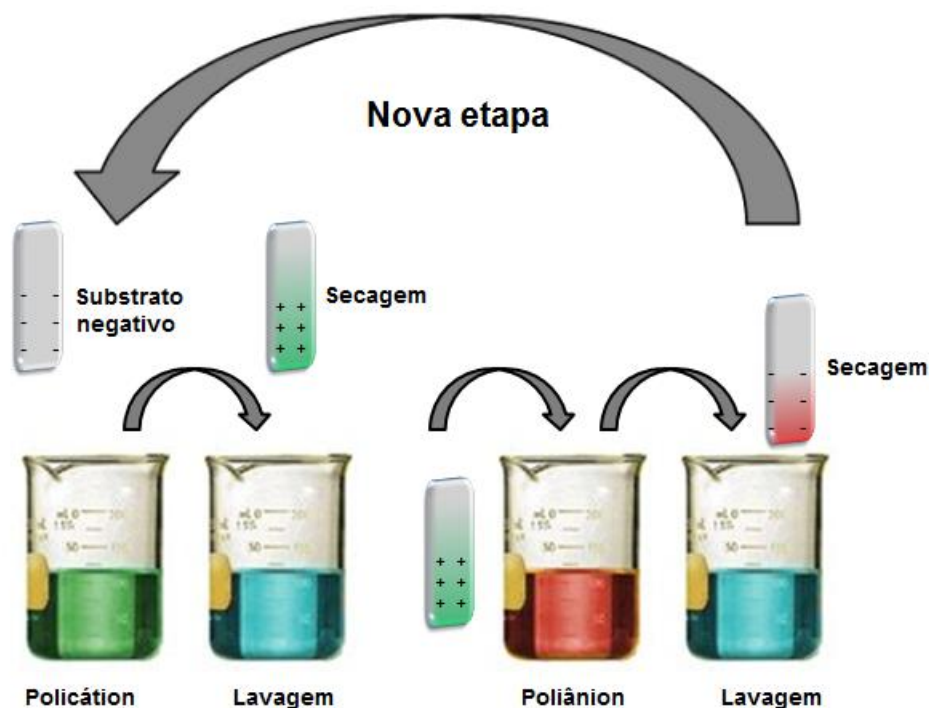


Figura 3.1 – Representação esquemática da técnica de automontagem camada por camada.

O monitoramento do processo de crescimento de um filme LbL pode ser realizado por espectroscopia de absorção UV-vis (28, 32) ou através da medida da massa do material adsorvido com auxílio de uma microbalança de cristal de quartzo (38). O tempo de adsorção, o pH e concentração do polieletrólito, bem como a força iônica da solução, são fatores que influenciam as propriedades de deposição e as características do filme. Assim, um estudo sistemático dessas condições deve ser previamente realizado a fim de se aperfeiçoar o processo de automontagem (28).

3.1 BIOSSENSORES BASEADOS EM FILMES LbL

Após Livov e colaboradores demonstrarem que biomoléculas preservam sua atividade após a imobilização pela técnica LbL (12, 33), esses filmes contendo materiais biológicos foram aplicados em biossensores (12, 39).

Ferreira e colaboradores automontaram a enzima glicose oxidase juntamente com o polímero poli(alilamina hidrocloreto) (PAH), para a detecção de glicose, um importante hemometabólito de interesse clínico (13). Por sua vez, Liu et. al. construíram filmes LbL de polianilina (PANI) e nanopartículas de SiO₂. Esses filmes foram aplicados como ISFET e EnFET (ISFET enzimático) para detecção do neurotransmissor acetilcolina (40).

Caruso et. al. alternaram (PAH) e poli estireno sulfonado (PSS) e utilizaram esses filmes como substratos para a imobilização de imunoglobulina G (IgG) e anti-IgG (41). A anti-IgG também foi imobilizada diretamente em filmes LbL pela deposição alternada com PSS (41). Nos dois casos, um biossensor de afinidade (imunossensor) foi construído.

Fernandes e colaboradores funcionalizaram a superfície de ITO com filmes LbL contendo dendrímeros PPID e ftalocianina tetrasulfonada de níquel (NiTsPc), um composto organometálico frequentemente utilizado em sensores (28). O sistema PPID/NiTsPc foi aplicado como um sensor tipo EGFET para a determinação de pH (28) e posteriormente como biossensor de glicose por Vieira et. al. (29).

3.2 O Dendrímero usado nos filmes LbL

Dendrímeros são macromoléculas sintéticas monodispersas, ramificadas, com estruturas bem definidas e peso molecular elevado, têm propriedades físicas e químicas bem específicas (73).

Dendrímero é derivado da palavra grega “dendron” (árvore) e “meros” (parte ou fração). São formadas por um núcleo que é uma molécula onde se liga os ramos, sendo estas moléculas ramificadas, simétricas. Esses são caracterizados por estruturas quase esféricas, tamanhos nanométricos, possui um elevado número de subgrupos funcionais reativos e espaços interiores protegidos. Essas combinações os tornam ideais para aplicações em diferentes áreas da química e medicina, eles se diferem dos polímeros convencionais por terem ramificações altamente regulares e a macromolécula ser bastante simétrica (74).

A Figura 3.2 mostra a comparação entre polímeros convencionais e os dendrímeros. Percebe-se que os dendrímeros possuem uma estrutura altamente definida com um alto grau de simetria, a presença de um núcleo central bem como a presença de grupos funcionais periféricos.

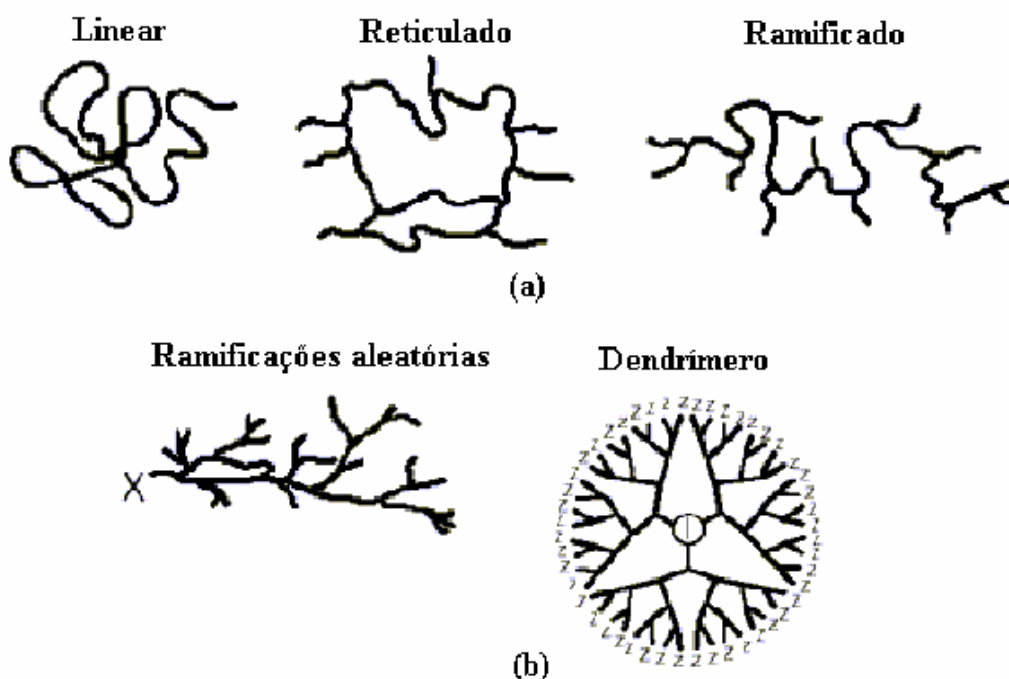


Figura 3.2 – (a) Estruturas poliméricas convencionais. (b) Estruturas dendríticas. Adaptado da referência (11).

Fernandes e colaboradores utilizaram o dendrímico poli(propileno imina) (PPID) na preparação dos filmes LbL, pois este possui elevada funcionalidade dos grupos terminais e alta densidade de grupos aminas ($-NH_2$), tornando-o assim, um material promissor para aplicações médicas. Eles podem ter seus grupos funcionais modificados em uma segunda etapa sintética e usados como sítio para imobilização de compostos bioativos. Devido a todas essas características o PPID se mostrou viável para ser utilizado em filmes para a imobilização de enzimas (28, 74). A Figura 3.3 ilustra a estrutura do dendrímico PPID.

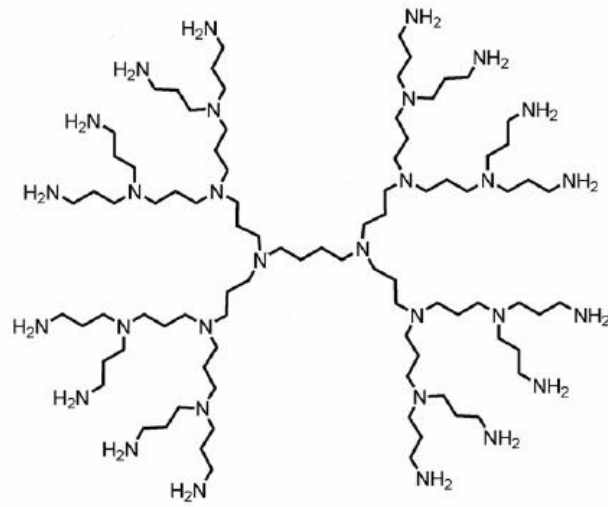


Figura 3.3 – Representação esquemática do dendrímero poli (propileno imina) (PPID)

Figura adaptada da referência (28).

4 AS ENZIMAS

Enzimas são catalisadores biológicos formados essencialmente pela repetição de aminoácidos como unidades monoméricas (42). Constituem um tipo de proteína com atividade catalítica, sendo encontradas na natureza em praticamente todos os seres vivos. Sua função é viabilizar a atividade celular, quebrando ou condensando moléculas para formar novos compostos de interesse para o metabolismo vegetal ou animal (42).

As enzimas contêm em sua estrutura um conjunto de aminoácidos dispostos espacialmente de maneira determinada formando uma cavidade de geometria específica denominada de centro ou sítio ativo e, às vezes, um grupo prostético (cofator) que pode ser orgânico (coenzima) ou íon metálico ativo (42). A atividade biológica de uma enzima depende de sua estrutura, do número de cadeias peptídicas, do arranjo das cadeias na molécula e da natureza do grupo prostético (se houver) (42).

Atualmente, devido ao grande número de processos de operações unitárias desenvolvidos para o isolamento, purificação, catálise e especificidade, as enzimas se tornaram atraentes como catalisadores para biotransformações e sua aplicação na indústria da biotecnologia foi e ainda é objeto de muitas investigações.

Atualmente, existem diversas técnicas de purificação de enzimas (diálise, métodos cromatográficos, eletroforese), os quais permitem que uma enzima de alta pureza possa ser obtida e usada em escala industrial ou analítica, proporcionando ao mesmo tempo a reutilização da mesma. O desenvolvimento das técnicas de imobilização de enzimas permitiu

o desenvolvimento de um vasto campo em número de aplicações desse biocatalisador no desenvolvimento de biossensores (8).

4.1 OS MODELOS DA AÇÃO ENZIMÁTICA

A função de uma enzima é aumentar a velocidade de uma reação, diminuindo a energia de ativação (E_a) para que a reação química se torne termodinamicamente favorável e, sua presença na reação, não afeta o equilíbrio químico da mesma, conforme é ilustrado na Figura 4.1. Uma reação catalisada por uma enzima pode se processar a 25 °C, 10^6 a 10^8 vezes mais rapidamente que uma mesma reação não catalisada enzimaticamente (42).

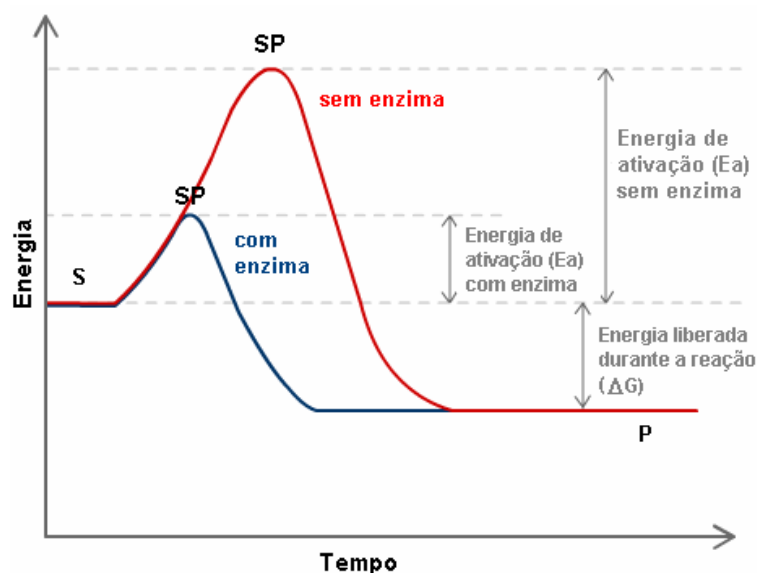


Figura 4.1 – Representação da energia de ativação de uma reação não enzimática (vermelho) e uma reação enzimática (azul). A enzima torna a reação termodinamicamente favorável. ΔG representa a energia livre de Gibbs e S e P representam o substrato (analito) e o produto reacional, respectivamente (11).

A explicação do mecanismo de interação entre uma enzima com e seu substrato foi inicialmente proposto pelo modelo de Fischer (43). De acordo Fischer, o sítio ativo da enzima e o substrato possuem formas geométricas semelhantes, ou seja, as interações entre uma enzima e seu substrato seriam através do tipo chave-fechadura (43). Dessa forma, o substrato (chave) se encaixa perfeitamente ao sítio ativo da enzima como se este fosse rígido analogamente a uma fechadura (Figura 4.2). Estados intermediários (ES e EP) são formados antes do produto (43). A flexibilidade da estrutura enzimática é um dos fatores que permite que moléculas estruturalmente semelhantes apresentem conformações e orientações relativas distintas no sítio de ligação do receptor e, em consequência, atividades e afinidades também diferentes.

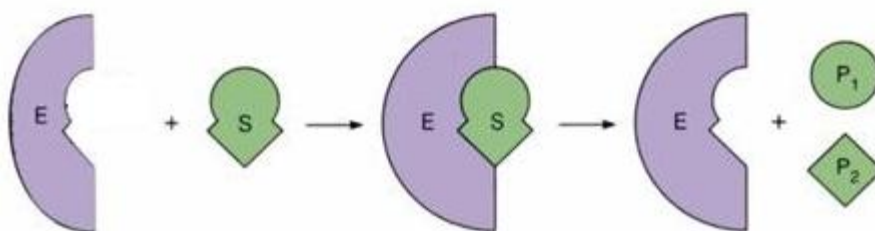


Figura 4.2 – Modelo chave-fechadura para ação enzimática proposto por Fischer. Adaptada da referência (44).

O modelo chave-fechadura de Fischer não faz nenhuma menção quanto à estabilização do estado de transição que ocorre. Um modelo mais preciso do tipo molecular para explicar a teoria da especificidade de uma enzima por seu substrato foi proposto Koshland e colaboradores em 1958 (45). Essa teoria sugere que, através da complexação, o substrato induz uma mudança conformacional na subunidade da enzima com a qual interage (sítio ativo) (45) (Figura 4.3). Essa mudança pode ser transmitida às subunidades vizinhas, induzindo na enzima uma conformação responsável pelo processo catalítico (45), o que explica melhor tanto a especificidade quanto a formação dos estados intermediários na reação enzimática.

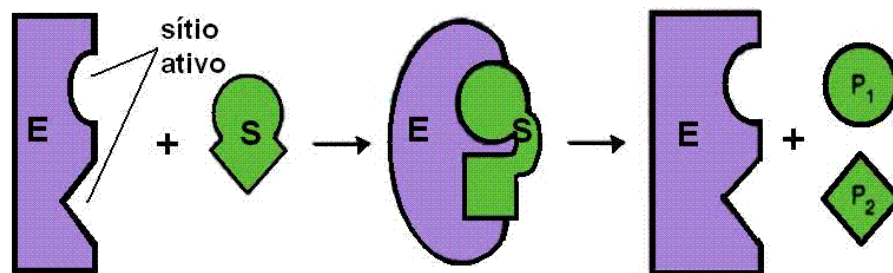


Figura 4.3 – Mudança conformacional do sítio ativo de uma enzima adaptando-se ao seu substrato proposto por Koshland. Figura adaptada da referência (44).

4.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Uma abordagem mais geral e quantitativa a respeito da ação enzimática foi proposta por Leonor Michaelis e Maud Menten em 1913 (42). Michaelis e Menten postularam que num primeiro passo, a enzima (E) se combina com o substrato ou analito (S) em um processo rápido e reversível, formando o complexo enzima-substrato (ES). Numa segunda etapa, mais lenta, o complexo enzima-substrato se quebra liberando o produto reacional e a enzima livre (42). A sequência dessas reações é escrita como (42):



Sendo k_1 a constante de velocidade de formação do complexo ES, k_2 a constante de velocidade da dissociação do complexo, k_3 a constante de velocidade da dissociação do complexo formando o produto (P) e v a velocidade de formação do produto ou consumo do substrato.

A velocidade de consumo do substrato, ou formação do produto, diminui com o tempo devido à diminuição da concentração de substrato no decorrer da reação enzimática

(42). Da equação (4.1), a velocidade de reação para o consumo de substrato e formação de produtos é dada por (42):

$$v = \frac{d[S]}{dt} = k_2[ES] - k_1[S][E] \quad (4.2)$$

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_3[ES] \quad (4.3)$$

Assim, a velocidade de consumo do complexo ES é descrita por (42):

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_2[ES] - k_3[ES] \quad (4.4)$$

Em um estado estacionário, no qual a taxa de formação do complexo ES é igual à taxa de dissociação, onde a concentração [ES] permanece constante, tem-se (42):

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \rightarrow k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES] \quad (4.5)$$

A enzima total está distribuída entre E e ES, ou seja, as duas formas livres de energia (42):

$$[E]_t = [E] + [ES] \quad (4.6)$$

De acordo com o princípio da conservação de massa:

$$[E] = [E]_t - [ES] \quad (4.7)$$

Substituindo a equação (4.7) na equação (4.6) e no seu resultado a equação 4.3, obtêm-se:

$$[ES] = \frac{k_1[E]_t[S]}{k_1[S] + k_2 + k_3} \quad (4.8)$$

A velocidade máxima da reação v_{\max} , é dada pela reação entre a concentração total da enzima e a constante de decomposição do complexo, assim expresso por (42):

$$v_{\max} = k_3[E]_t \quad (4.9)$$

Substituindo a equação (4.9) pela (4.8), obtém-se a chamada equação de Michaelis e Menten.

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{[S] + k_m} \quad (4.10)$$

Sendo K_m é a constante de Michaelis e Menten, dada então por:

$$k_m = \frac{k_1 + k_2}{k_1} \quad (4.11)$$

Quando v é a metade v_{\max} , tem-se a seguinte equação:

$$\frac{v_{\max}}{2} = \frac{v_{\max} [S]}{k_m + [S]} \quad (4.12)$$

Dividindo por v_{\max} e isolando K_m , tem-se

$$k_m = [S] \quad (4.13)$$

Quando:

$$v = \frac{1}{2} v_{\max} \quad (4.14)$$

A Equação 4.13 indica que K_m equivale à concentração do substrato $[S]$ quando V é igual à metade de v_{\max} , conforme pode ser melhor visualizado na Figura 4.5. A constante de Michaelis e Menten é interpretada como sendo o inverso da afinidade da enzima pelo seu substrato, ou seja, quanto menor for seu valor, maior será a afinidade da enzima (42).

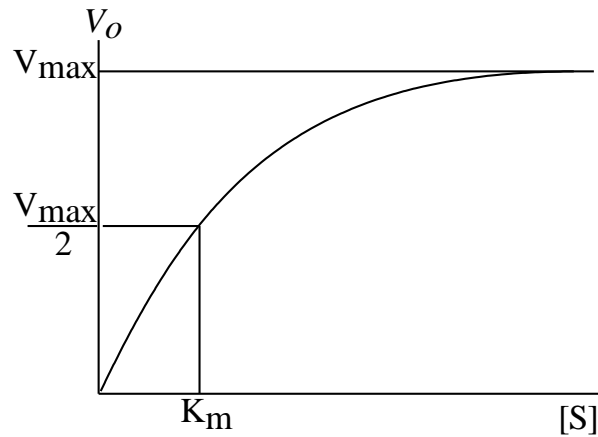


Figura 4.4 – Curva de saturação de uma reação enzimática, mostrando a relação entre a concentração de substrato ($[S]$) e a velocidade (V). K_m equivale à concentração do substrato $[S]$ quando V é a metade de V_{max} (42).

4.3 A TIROSINASE

A enzima tirosinase, monofenol oxidase (E.C.1.14.18.1), também conhecida como polifenoloxidase (PFO), cresolase, catecol oxidase ou o-difenol oxigênio redutase foi descoberta em 1895 quando Bourquelot e Bertrand observaram o aparecimento de uma coloração escura no cogumelo após este ter sido exposto à tirosinase (46). A nomenclatura se refere ao tipo de substrato catalisado e/ou devido à atividade da enzima (47, 48).

A tirosinase é sintetizada somente em tecidos em desenvolvimento e estocada nos plastídeos sendo encontrada praticamente em todos os tecidos vegetais em concentrações especialmente altas em: cogumelo, batata, pêsego, maçã, banana, manga, abacate e café (49).

Quanto à sua estrutura molecular, as polifenoloxidasas são enzimas tetraméricas, com uma massa molar que variam de 57 kDa a 62 kDa com exceção da polifenoloxidase do cogumelo que apresenta massa molar igual a 128 kDa que possui duas cadeias maiores com 43-45 kDa cada e duas menores com 13 kDa cada (46). Cada um dos sítios ativos consiste em dois átomos de cobre coordenados com histidinas. A Figura 4.5 ilustra a estrutura da tirosinase em sua representação de fitas (54).



Figura 4.5 – Estrutura de fitas representando a enzima tirosinase. No centro está representado seu sítio ativo composto por átomos de cobre ligados por histidinas (50).

A tirosinase é uma enzima que catalisa a o-hidroxilação de monofenóis e a subsequente oxidação do o-difenol resultante em o-quinonas. Ela também pode converter monofenóis em duas etapas, ambas utilizando oxigênio molecular. Na primeira etapa o monofenol é hidroxilado a o-difenol. Essa etapa é conhecida como atividade hidroxilase da enzima. Num segundo momento, o composto o-difenol é oxidado a o-quinona (atividade difenolase da enzima). A tirosinase é oxidada de volta à sua forma nativa pelo oxigênio molecular. As reações supracitadas estão representadas esquematicamente na Figura 4.6 abaixo (51):

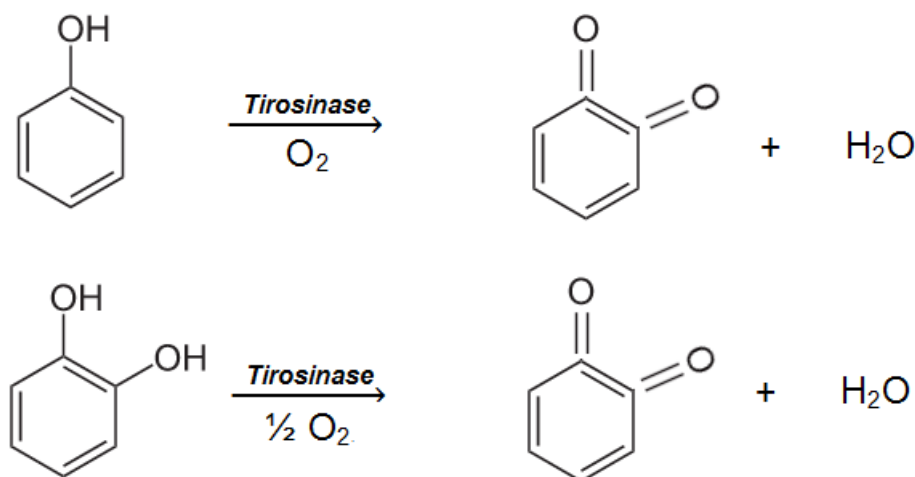


Figura 4.6 – Reação de o-hidroxilação de monofenóis e a subsequente oxidação do o-difenol resultando em o-quinonas (51).

Geralmente, em biossensores, opta-se por utilizar enzimas purificadas. Contudo, fontes ricas em enzimas podem ser utilizadas como formas alternativas. O Brasil apresenta uma grande variedade de tecidos vegetais, o que vem potencializando diversas fontes de enzimas que podem ser utilizadas no desenvolvimento de biossensores (52). Enzimas extraídas de fontes vegetais tem sido bastante utilizadas em substituição das enzimas purificadas por terem um custo extremamente baixo (53).

A tirosinase vem sendo utilizada para esse propósito desde a década de 90, onde Fatibello Filho e colaboradores utilizaram o extrato bruto do inhame como fonte de tirosinase imobilizada em uma membrana de acetato de celulose (51). O sistema foi aplicado como biossensor para a determinação de compostos fenólicos apresentando eficiente detecção (51). Recentemente, Barioto et. al. utilizaram o extrato bruto do abacate (*Persea americana*) como fonte de tirosinase. O sistema foi aplicado como biossensor amperométrico baseados em filmes de polímeros condutores (polipirrol) (54).

Neste trabalho, optamos por utilizar a tirosinase extraída do abacate, em parceria com a professora Dr. Débora Gonçalves e seu aluno de doutorado André Brisolari (*in*

memorian) do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC – USP). Esse sistema já foi amplamente caracterizado e é atualmente utilizado pelo Grupo de Polímeros Bernhard Gross do IFSC (54).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo se destina à apresentação dos materiais e métodos utilizados nesse trabalho. A técnica de síntese e caracterização do dendrímero PPID, a obtenção e caracterização do extrato bruto de tirosinase a partir do abacate, a automontagem desses materiais sobre substratos de ITO, bem como as técnicas de caracterização dos filmes LbL obtidos, são apresentados. A configuração experimental do dispositivo de efeito de campo utilizado como sensor de pH e a configuração do biossensor para a detecção de compostos fenólicos também é descrita em detalhes.

5.1 O SUBSTRATO DE ITO

O óxido de índio dopado com estanho ou ITO é o óxido condutor transparente mais amplamente utilizado como eletrodo (55). Ele é constituído de uma mistura de óxido de índio (In_2O_3) e óxido de estanho (SnO_2), geralmente em proporções de 90% e 10%, respectivamente, o que lhe confere uma baixa resistividade elétrica (10^{-4} - 10^{-6} $\Omega\cdot\text{cm}$), boa estabilidade físico-química e morfologia superficial.

O ITO também tem como característica, seu comportamento anfotérico, ou seja, ele se comporta como ácido ou base dependendo do meio reacional, fato que sugere sua aplicação como sensor de pH (30). Não obstante, a presença de grupos OH na superfície do ITO facilita a adsorção dos grupos carboxílicos e/ou grupos amina através de ligações de hidrogênio para a adsorção de enzimas (56, 57).

Neste trabalho foram utilizados filmes de ITO comerciais proveniente da empresa Delta-Technologies com uma resistividade de superfície $R_s = 8 - 10 \Omega$. Os substratos de ITO nas dimensões de 5 mm x 10 mm foram imersos em acetona e agitados em ultra-som por 15 min, seguido de lavagem com água ultrapura. Em seguida, os substratos de ITO foram mergulhados em uma solução de HNO_3 : HCl : H_2O (1:3:20) (água régia diluída) por 10 min e em seguida num béquer contendo água ultrapura novamente. O procedimento descrito acima proporciona a formação de ilhas e um aumento da rugosidade dos substratos, proporcionando uma melhor adesão de filmes automontados sobre os mesmos (58).

5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO DENDRÍMERO PPID

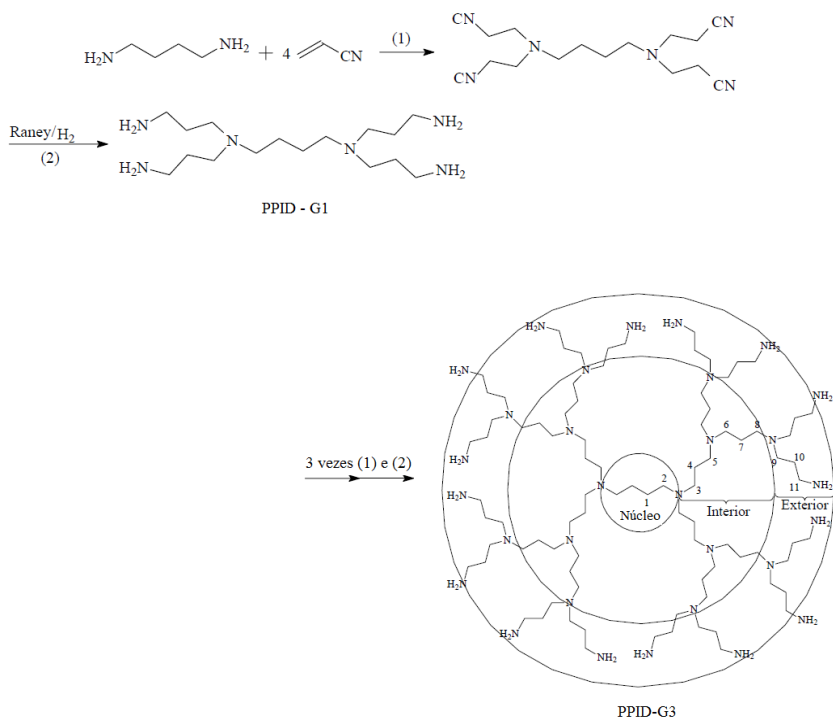
Neste trabalho a estratégia utilizada na síntese do dendrímero poli(propileno imina) (PPID) de geração 3 (G3) envolveu a reação de adição da acrilonitrila (Sigma-Aldrich) ao etilenodiamina (EDA, Sigma-Aldrich) seguido de hidrogenação catalítica dos grupos nitrílicos com o catalisador de Níquel Raney (Sigma-Aldrich) (59)

Uma mistura reacional de acrilonitrila e etilenodiamina proporção molar de 5:1 foi aquecida a 90°C por 2 horas, sendo o excesso de acrilonitrila removido por destilação azeotrópica sob vácuo (0,0197 atm, 38 °C). A hidrogenação catalítica dos grupamentos nitrílicos foi efetuada em reator de hidrogenação tipo autoclave utilizando como catalisador o

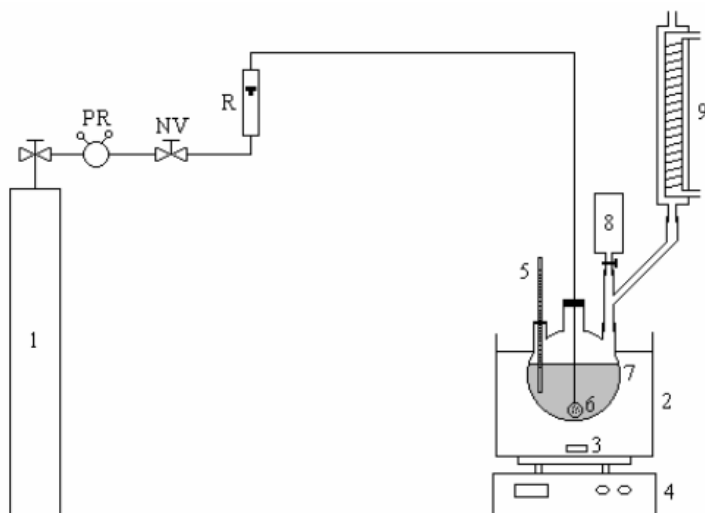
Níquel de Raney (tamanho de poro igual a 50 μm e área superficial de 90 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ e conteúdo de níquel de 75.11%). Desse modo é obtido o dendrímero poli(propileno imina) de geração 1 (PPID-G1) que é utilizado como precursor na obtenção do PPID de geração 3 (PPID-G3). Para a reação de hidrogenação, o dendrímero PPID G1 foi dissolvido em metanol e hidrogenado a 80°C sob pressão de hidrogênio de 50 atm por 2 h. A mistura reacional foi filtrada para remover o catalisador e o metanol foi destilado sob pressão reduzida. O dendrímero PPID obtido nessa primeira etapa é o de primeira geração. A repetição de duas etapas posteriores levou à obtenção do PPID de geração 3 com peso molecular de 1,25 kDa com 14 grupos aminas terciárias e 16 grupos aminas terminais. A Figura 5.1a ilustra o mecanismo reacional simplificado para a obtenção do PPID-G3 e a Figura 5.1b ilustra o processo de hidrogenação catalítica.

A estrutura do dendrímero PPID-G3 foi caracterizada por ressonância magnética nuclear de prótons ($^1\text{H-NMR}$) em um espectrômetro da marca Bruker 300 operando a 330,7 MHz. Clorofórmio deuterado (CDCl_3) foi utilizado como solvente e uma concentração de 20 mg.mL^{-1} foi preparada.

A análise do PPID-G3 quanto ao seu peso molecular foi efetuada em um equipamento Maldi-MS Bruker Proflex III equipado com fonte de laser de nitrogênio (3 ns) emitindo em 337 nm. O espectro foi adquirido no modo reflectron. O detector foi operado no modo de aquisição de íons. A voltagem de pulso foi ajustada para 2,4 kV. Para obter uma melhor resolução do espectro, a intensidade do laser foi ajustada para altos níveis de energia. Uma amostra de 5,0 μL de PPID-G3 foi depositada diretamente na placa do equipamento Maldi e seca à temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, uma solução saturada em acetona da matriz ácido 3-indol-acrílico foi adicionada sobre a amostra e seca à temperatura ambiente.



(a)



(b)

Figura 5.1 – Ilustração do mecanismo reacional simplificado para a obtenção do dendrímero PPID-G3 (a) e do processo de hidrogenação (b). Na Figura (b) tem-se: cilindro de hidrogênio (1), regulador de pressão (PR), válvula (NV), rotâmetro (R), banho de óleo (2), barra magnética (3), agitador magnético (4), termômetro (5), dispersor (6), balão tribulado (7), funil dosador (8) e condensador de serpentinas (9).

5.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE TIROSINASE

O abacate (*Persea americana*) foi utilizado como fonte alternativa de tirosinase. A metodologia utilizada foi a mesma introduzida por Vieira (60) e posteriormente utilizada por Lupetti (46). Ou seja, uma massa de 25 g de polpa de abacate foi homogeneizada por 3 min juntamente com 100 mL de solução a pH 7,0 e 2,5 g do composto polyclar (SB-100) poli (vinil pirrolidona) utilizado como estabilizante. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado em uma centrífuga a 4°C a 15000 rpm por 30 min. O sobrenadante (fonte rica em tirosinase) foi retirado então cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta e armazenado também a 4°C.

A formação de o-quinona com o catecol, medida por espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (Hitachi U-2001) foi utilizado como parâmetro para determinar a atividade do extrato obtido. Para essa finalidade, concentrações conhecidas de catecol foram adicionadas em uma cubeta de quartzo (caminho óptico de 10 mm) contendo o extrato bruto de tirosinase. A absorção de luz a um comprimento de onda de 405 nm (banda típica da o-quinona) foi medida durante os primeiros 180 s a cada adição de catecol na cubeta. Todos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente e em triplicatas.

5.4 CRESCIMENTO DOS FILMES PPID/TIROSINASE

Os filmes automontados de PPID/Tirosinase foram preparados através da imersão alternada dos substratos de ITO nas soluções de PPID-G3 (1 mg.mL^{-1}) e tirosinase no extrato bruto. Os substratos foram imersos na solução policatiônica de PPID-G3 durante 5 min e na solução polianiônica de tirosinase (da forma que foi obtida, extrato bruto do abacate) durante 10 min. Após cada imersão, o substrato pré-coberto com PPID-G3 foi lavado com água ultrapura e, a cada imersão no extrato bruto de tirosinase, o substrato foi lavado com solução tampão fosfato (mistura de fosfato de sódio monobásico e dibásico a 10 mM). A secagem de cada camada foi realizada suavemente através de fluxo de N_2 a temperatura ambiente. O número desejável de bicamadas de PPID/Tirosinase era facilmente alcançado com repetição do ciclo descrito acima. O crescimento dos filmes LbL foi monitorado por espectrofotometria UV-vis. Foram fabricados filmes contendo 5 e 10 bicamadas.

5.5 CONFIGURAÇÃO DO BIOSSENSOR

No presente trabalho, utilizamos um dispositivo potenciométrico constituído a partir de um amplificador de instrumentação AD620 o qual possui uma alta impedância de entrada: (29). A alta impedância de entrada é um requisito necessário para que o sistema não gere nem drene corrente no sistema. Os filmes formados por ITO-PPID/Tirosinase foram conectados no terminal de entrada do amplificador AD620. Um eletrodo de referência (AgCl/Sat-KCl) foi usado para manter uma tensão constante. Todos os testes foram feitos em triplicatas.

Os filmes ITO-PPID/Tirosinase foram imersos em uma solução tampão fosfato de baixa força iônica (~ mM) e concentrações conhecidas de solução de fenol ou catecol foram adicionadas no béquer de medida. A voltagem de saída do AD620 foi registrada ao longo do tempo por um multímetro Keithley 195 A comandado por computador via porta USB/GPIB. A Figura 5.2 mostra esquematicamente o setup experimental do biossensor.

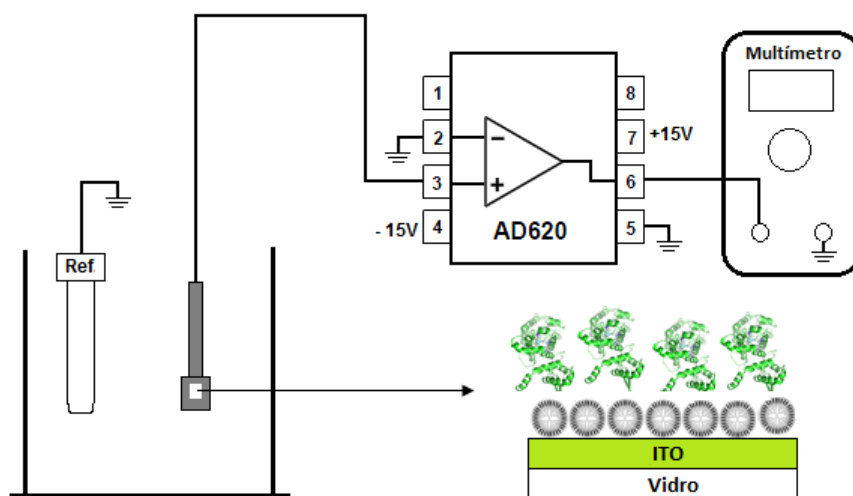


Figura 5.2 – Esquema do Setup experimental do biossensor utilizado.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DO DENDRÍMERO PPID

A Figura 6.1 mostra a ressonância magnética nuclear de prótons (^1H) e carbono (^{13}C) do PPID-G3 em clorofórmio deuterado (CDCl_3) obtido a 300 MHz. Os deslocamentos (δ 's) no espectros ^1H característicos do dendrímero PPID-G3 são observados a entre 1,79 ppm e 2,18 ppm ($-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$) e; 3,20 ppm e 3,31 ppm ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$) (Figura 6.1a) (61).

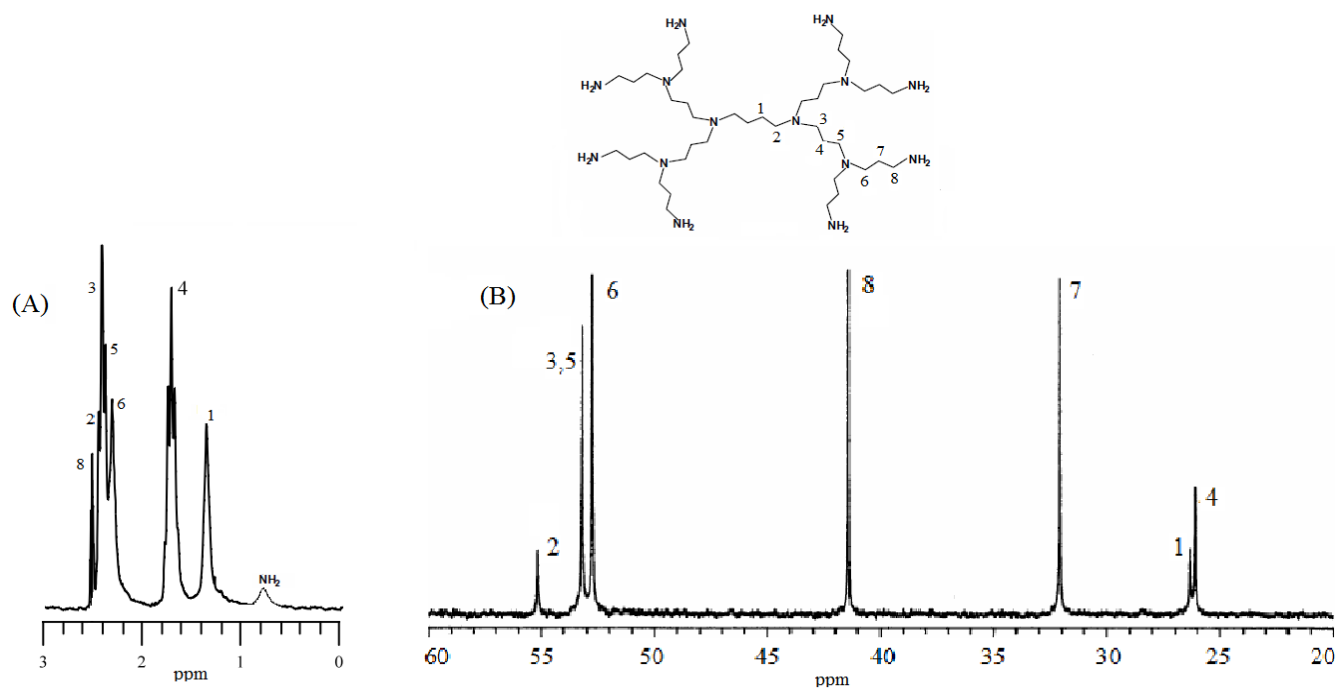


Figura 6.1 – Ressonância magnética nuclear do dendrímero PPID-G3 sintetizado: espectro ^1H (300 MHz) (A) e ^{13}C (75 MHz) (B). Solvente utilizado: CDCl_3 , temperatura da medida: ambiente (25 °C). Referência interna: Tetrametil silano (TMS). Concentração do PPID: 53 mM.

O espectro de ^{13}C -RMN exibiu o deslocamento característico do grupo imina a 41,14 ppm e deslocamentos (δ) a 26 ppm, 32 ppm, 41,5 ppm e 53 ppm, característicos dos grupos amino terminais existentes na periferia do dendrímero. Não foram observados sinais a 45.1 ppm, característico de grupos da acrilonitrila não reduzidos (NHCH,CH,CN) o que indica que todos os grupamentos CN na periferia do dendrímero PPID-G3 foram convertidos a NH_2 (59).

A obtenção do PPID-G3 com estrutura molecular bem definida e ao mesmo tempo com propriedades físico-químicas específicas (por exemplo, protonação) é um desafio do ponto de vista sintético, sendo sua caracterização de vital importância na tentativa de elucidar e compreender como a estrutura química, a morfologia e outras propriedades físicas estão relacionadas às características desejada ou apresentadas por estes materiais na modificação da porta de dispositivos semicondutores via automontagem.

Atualmente, o desenvolvimento de técnicas de ionização mais suaves a exemplo da espectrometria de massa MALDI (*matrix - assisted laser desorption/ionization*) permite uma análise rigorosa da massa molar de dendrímeros por processos de vaporização sem degradação da macromolécula. A espectrometria de massa MALDI consiste em um processo de remoção de moléculas de polímeros dispersas em uma matriz orgânica. Um pulso de laser ultravioleta é incidido contra a amostra depositada sobre uma placa metálica. O papel da matriz neste processo é o de mediadora de absorção da energia do laser. A matriz absorve grandes quantidades de energia e a transfere para as moléculas do polímero. A energia do laser excita as moléculas da matriz causando sua vaporização e decomposição a um estado iônico. Como consequência dessa mudança de estado, uma nuvem composta de moléculas de matriz e do polímero ionizado é formada em fase gasosa.

Em geral, íons são formados pela remoção ou adição de elétrons, gerando um radical, ou através da reação de adição com outras espécies carregadas em fase gasosa. Todavia, polímeros sintéticos não adquirem carga facilmente, sendo, na maioria das vezes, necessário a

adição de um sal a matriz para uma adição efetiva de íons ao polímero. A matriz, constituída por moléculas cristalizadas transporta as moléculas do polímero ionizado para a fase gasosa e servem como doadores e receptores de prótons. As moléculas do polímero ionizadas, nesse trabalho o PPID-G3, sofrem uma aceleração para um detector onde todos os íons recebem a mesma quantidade de energia cinética. Apesar de terem a mesma energia, a massa é diferente e podem alcançar o detector em diferentes tempos. Os detectores convertem o sinal para um espectro de massa com o m/z na abscissa e o número de íons/intensidade na ordenada. Os íons com menores massas alcançam o detector primeiro porque a sua velocidade é maior, enquanto que os íons mais massivos levam mais tempo, daí o nome TOF (*time-of-flight*), que se deve ao fato da massa ser determinada a partir do tempo de vôo dos íons no espectro (72). A Figura 6.2 ilustra o método MALDI-TOF que realça em (a) a amostra co-cristalizada com a matriz irradiada por um feixe de laser, levando à sublimação e ionização de uma macromolécula e em (b) após o laser, um campo de forte aceleração confere uma energia cinética fixa para os íons produzidos pelo processo de MALDI. Uma particularidade do espectro de massa obtido num MALDI é que independente do tipo de amostra analisada, apenas espécies com uma única carga são formadas. Entretanto o mecanismo de ionização que possibilitaria explicar este comportamento ainda não foi elucidado completamente.

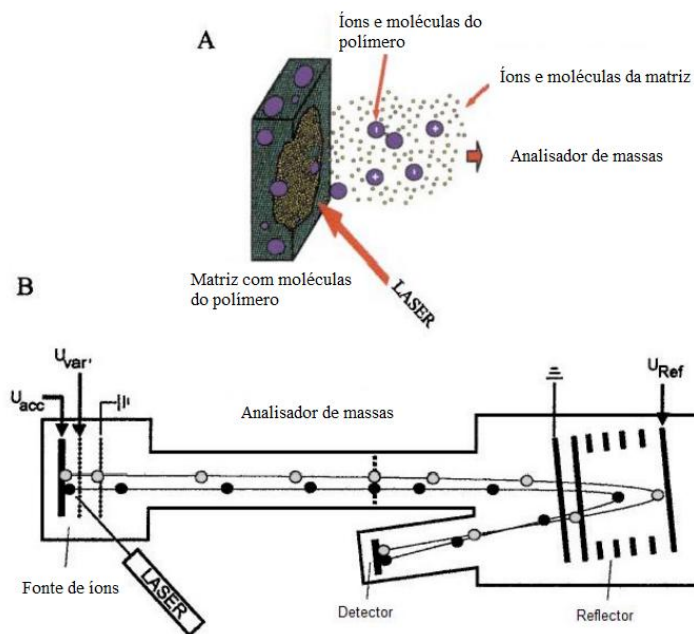


Figura 6.2 – Ilustração da técnica MALDI-ToF. Adaptado da referência (71).

No caso desse trabalho, o espectro MALDI-TOF fornece informações importantes a respeito da pureza do PPID além da distribuição de peso molecular. A presença de impurezas ou defeitos na estrutura do dendrímero poderia contribuir para uma performance inadequada do dispositivo biossensor. O espectro MALDI-ToF do PPID-G3 sintetizado é apresentado na Figura 6.3. A população de íons mostra uma mistura isomolecular de íons, característico de estruturas dendríticas. As espécies iônicas observadas correspondem a uma estrutura de PPID sem defeitos (ramificações indesejadas) sendo que o maior pico corresponde a espécies moleculares com m/z igual a 1206 $[M + H]^+$ e 1215 $[M + Na]^+$. O valor calculado para m/z para o PPID-G3 foi igual a 1250 Da, em boa concordância com uma estrutura simétrica e isomolecular de um dendrímero PPID.

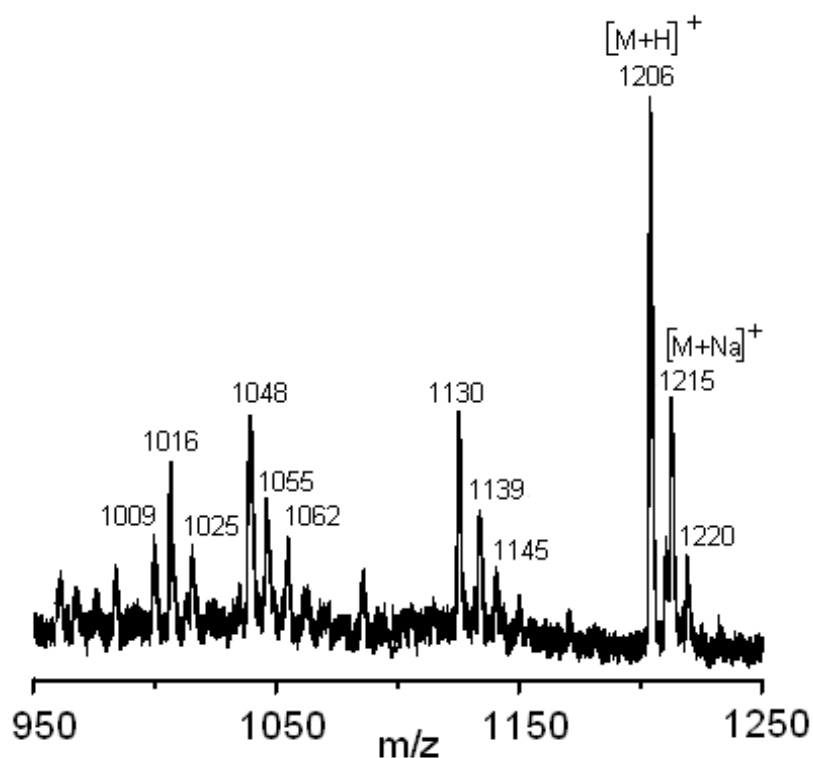


Figura 6.3 – Espectro MALDI-TOF do dendrímero PPID G3.

6.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE TIROSINASE

A Figura 6.4 mostra o espectro de absorvância na região de UV-vis de uma solução de catecol (0,1 M) após a mesma ser exposta ao extrato bruto de tirosinase. Observa-se uma banda larga em torno de 405 nm. Essa banda é típica de estruturas do tipo o-quinona e é formada devido à oxidação catalítica promovida pela tirosinase (2, 60). Esse resultado indica que o extrato obtido a partir da polpa do abacate contém tirosinase na forma ativa (2, 60).

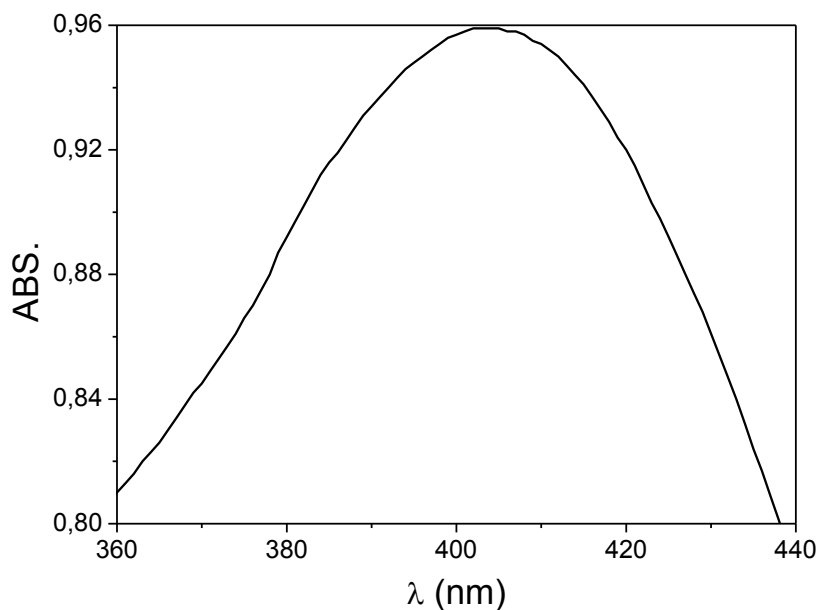


Figura 6.4 – Espectro de absorvância de uma solução de catecol (1mL) contendo 0,2 mL do extrato bruto de tirosinase.

Uma vez fixado o comprimento de onda fixado em 405 nm, a cinética do extrato bruto contendo tirosinase foi analisada através do monitoramento de medidas da variação da absorvância durante a reação de oxidação do catecol pela tirosinase. Diferentes concentrações de catecol foram utilizadas de (0,5 mM até 10 mM) sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 6.5. Observa-se um aumento da absorção com o aumento da concentração de catecol tendendo a um ponto de saturação, ou seja, um comportamento típico de enzimas que obedecem à cinética de Michaelis e Menten (42).

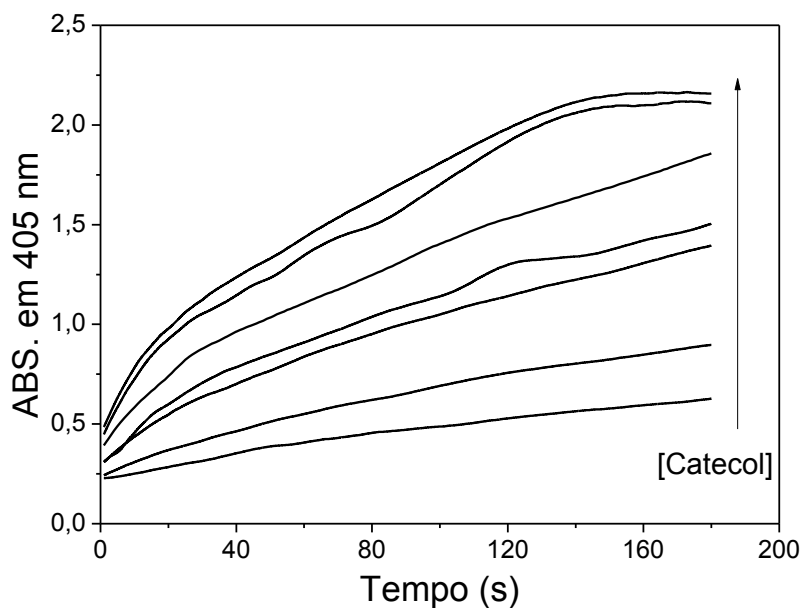


Figura 6.5 – Curvas da absorvância em 405 nm vs tempo obtidas a partir de diferentes concentrações de catecol (0,5 mM, 1 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM, 9 mM e 10 mM) a uma quantidade fixa de tirosinase. Condições experimentais: tampão fosfato 10 mM, pH 6.5.

O resultado anterior é melhor observado na Figura 6.6, onde o pico máximo de absorvância (em 180 s) foi tomado a partir das curvas da Figura 6.5. Observa-se na Figura 6.6 que a velocidade da reação da enzima aumenta com a concentração do substrato, atingindo um valor máximo a 184,5 mM/min. A partir deste valor, o aumento da concentração de substrato não provoca um aumento significativo no valor da velocidade de reação, logo K_m equivale à concentração de substrato [S] quando a velocidade máxima é 184,5 mM/min. O valor encontrado foi de $K_m = 5,14$ mM, resultado este condizente com os valores comumente encontrados na literatura para a tirosinase em extrato bruto a partir de outras fontes, como o cogumelo (62), a banana (63), a alcachofra (64), o feijão (65) e o pêssego (75).

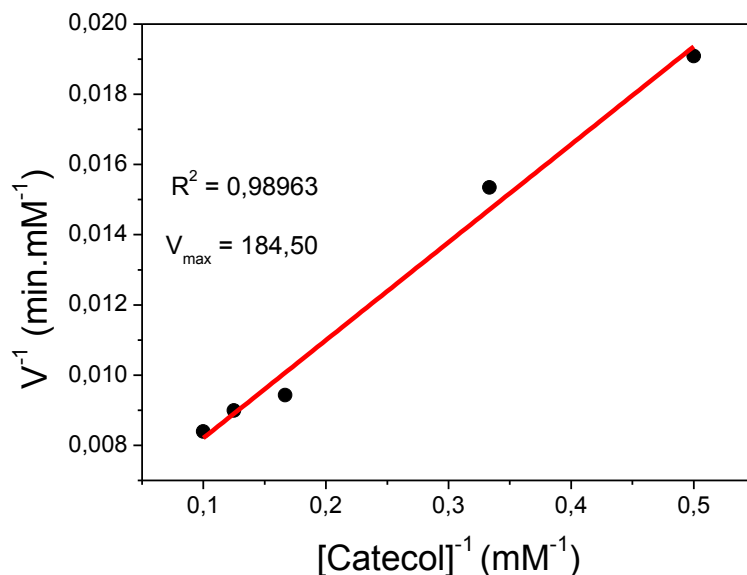


Figura 6.6 – Ajuste linear entre o inverso da velocidade de reação e o inverso da concentração de substrato (catecol) para o extrato bruto de tirosinase. Condições experimentais: tampão fosfato 10mM, pH 6.5.

6.3 ITO COMO SENSOR DE PH

O ITO já foi bastante estudado e testado como sensor de pH e apresenta sensibilidade em torno de 58 mV.pH^{-1} quando se usa o AI como seguidor de tensão (30). A Figura 6.7 mostra a resposta dinâmica ao pH do substrato de ITO comercial. A medida foi realizada através da imersão do filme de ITO sem funcionalização em diferentes soluções tampão fosfato 10 mM. Uma sensibilidade de $57,2 \text{ mV.pH}^{-1}$ foi calculada através leitura da tensão a um determinado período de tempo (Figura 6.8), com um excelente coeficiente de correlação (R^2). Os resultados obtidos estão em excelente concordância com os valores reportados por

Yin e colaboradores que utilizaram filmes de ITO provenientes de outra empresa (30) e com filmes de ITO sintetizados via anodização (66).

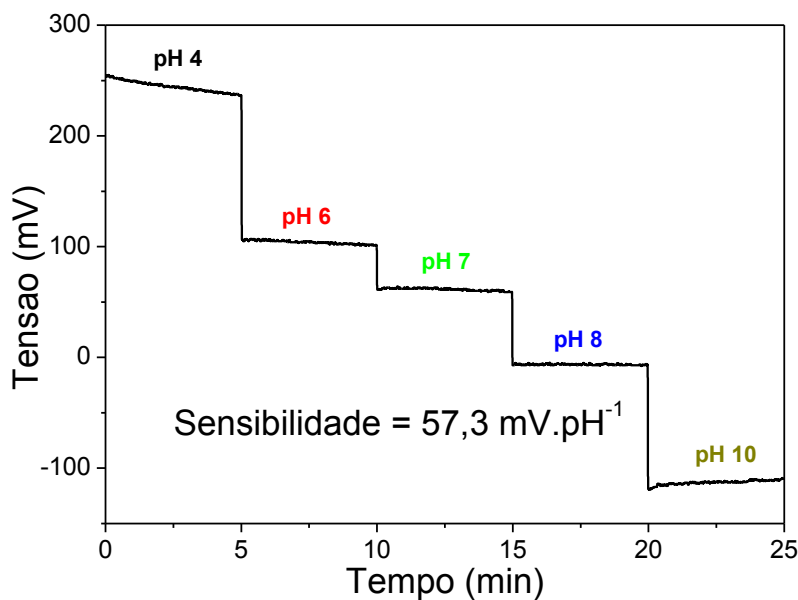


Figura 6.7 – Resposta típica ao pH de filmes de ITO comerciais utilizados como sensor de pH. As medidas foram efetuadas a temperatura de 25°C, com pH 4.0, 6.0, 7.0, 8.0 e 10.0 tampão fosfato 10 mM.

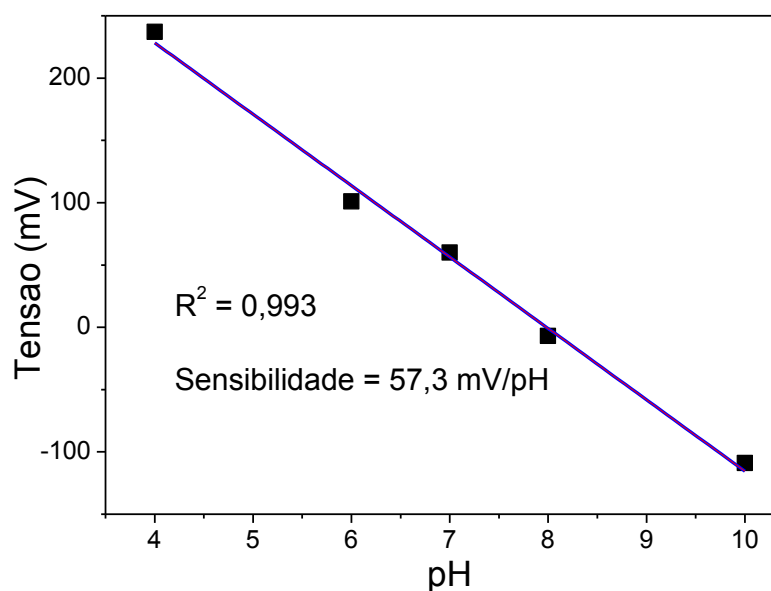


Figura 6.8 – Sensibilidade ao pH dos filmes de ITO à temperatura 25°C.

A sensibilidade ao pH dos filmes de ITO pode ser explicada pelo conhecido modelo de sítio de ligação (*site binding*) (67, 68). De acordo com este modelo, a superfície dos óxidos

ou nitretos metálicos anfotéricos (A), apresentam espécies químicas em três formas distintas: negativas (AO^-), neutras (AOH) e positivas (AOH_2^+). Dessa forma, as seguintes reações de ligação ocorrem da superfície do óxido (67, 68):



Essas ligações alteram o potencial na superfície do óxido com a mudança de pH, modulando assim o sinal de saída do dispositivo.

6.4 CRESCIMENTO DOS FILMES AUTOMONTADOS

Inicialmente, mediu-se o espectro de absorbância da solução diluída do extrato bruto de tirosinase, com o intuito de verificar o máximo de absorbância da tirosinase, que se mostrou em 276 nm (Figura 6.9, linha em preto). Como esperado para enzimas, foi observado uma banda em cerca de 280 nm, devido à presença de aminoácidos aromáticos como triptofano, tirosina e fenilalanina. Foi realizada então a automontagem dos filmes em substratos de quartzo que são transparentes na região do ultravioleta onde a enzima absorve. Novamente mediu-se o espectro para um filme PPID/Tirosinase composto por 10 bicamadas. Como pode ser visto na Figura 6.9 (linha em vermelho), verifica-se que a banda de absorção está um pouco deslocada para o vermelho. Esse resultado comprova que a enzima tirosinase é de fato adsorvida ao PPID. A forte interação entre os componentes do filme pode estar associada à interação eletrostática entre grupos NH_3^+ provenientes do dendrímero e grupos OH^- presentes

na tirosinase . A redução da intensidade do máximo de absorção na Figura 6.9 deve-se apenas à redução da quantidade de tirosinase presente no filme em comparação à solução.

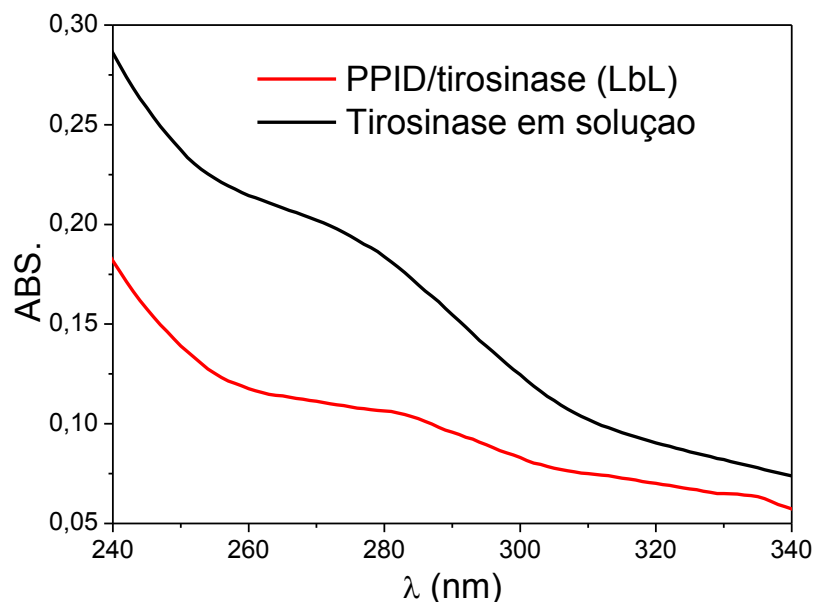


Figura 6.9 – Espectro de absorvância da solução do extrato bruto de tirosinase (preto) e do filme PPID/Tirosinase (vermelho).

Realizou-se então o estudo do crescimento do filme, ainda sobre o substrato de quartzo, medindo-se a absorvância a cada camada depositada. Os resultados são mostrados na Figura 6.10, onde se observa um crescimento linear do filme, indicando que o número de sítios ativos para a adesão do bioconjugado PPID-Tirosinase não alcançou a saturação. Dessa forma, pode-se concluir que a cada etapa do processo de automontagem, a mesma quantidade de material foi absorvida ao filme LbL, indicando que a técnica de automontagem foi bem sucedida (32).

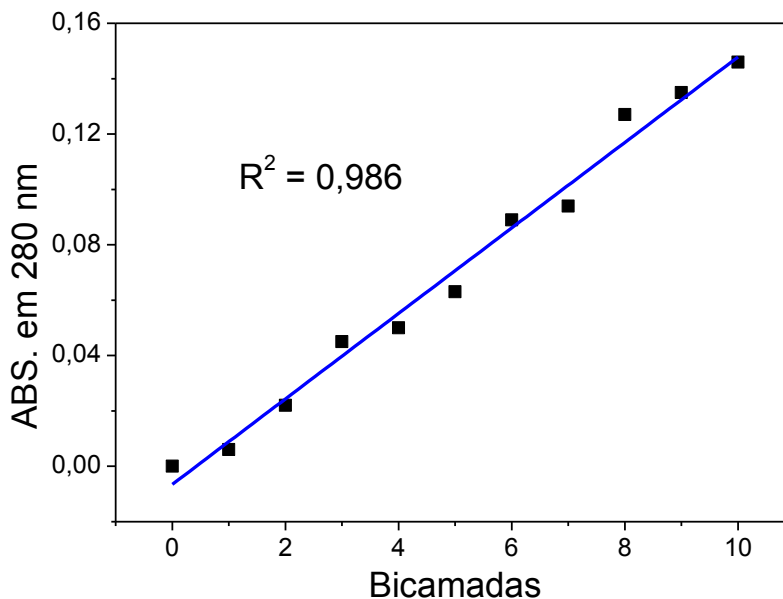


Figura 6.10 – Absorvância em 280 nm em função do número de bicamadas PPID/Tirosinase.

6.5 DISPOSITIVO BIOSSENSOR DE FENOL E CATECOL

6.5.1 ESTUDO DO NÚMERO DE BICAMADAS

A partir do estudo de crescimento do filme, escolheu-se aleatoriamente como biossensor, filmes automontados em substratos de ITO compostos por 5 e 10 bicamadas de PPID/Tirosinase. Analisou-se então o sinal dos dois biossensores propostos. Para tal, foram adicionadas alíquotas conhecidas de analito (neste caso, fenol) na célula de medida, resultando em uma concentração final de 0,5 mM. A resposta para os dois sistemas é mostrado na Figura 6.12. Observa-se um tempo de resposta em torno de 480 s para o filme composto de 5 bicamadas e um tempo bem maior para o filme composto por 10 bicamadas. Este fato, certamente está relacionado com a difusão do analito para as camadas mais internas que contêm tirosinase, resultando em uma redução no sinal, devido ao baixo rendimento

catalítico de filmes composto por um número elevado de bicamadas. Filmes mais finos, como no caso de 5 bicamadas, são portanto mais eficientes. Logo, apesar de o crescimento do filme ser linear, não há necessidade de escolher um número muito elevado de bicamadas para os testes posteriores, já que isto não tem uma influência negativa na resposta do biossensor.

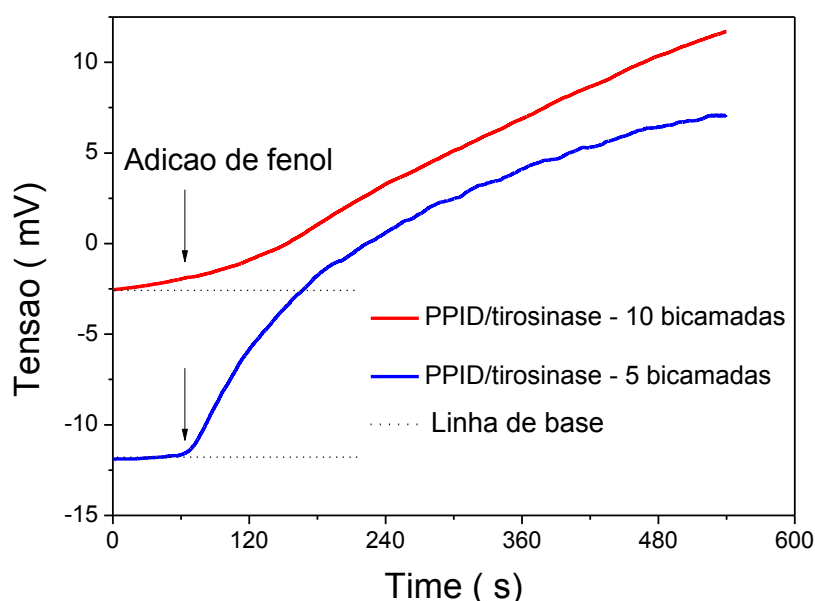


Figura 6.11 – Resposta do biossensor ITO-PPID/Tirosinase frente à adição de 0,5 mM de fenol para 5 bicamadas (azul) e 10 bicamadas (vermelho). Condições experimentais: tampão fosfato 10 mM, pH 6,5.

6.5.2 SENSIBILIDADE AO PH DOS FILMES DE ITO FUNCIONALIZADOS COM PPID/TIROSINASE

Após a automontagem de 5 bicamadas de PPID/Tirosinase sobre substratos de ITO, os mesmos foram imersos em diferentes soluções tampão de baixa força iônica (10 mM), ou seja, aquelas soluções utilizadas nas medidas de biossensoriamento. Os resultados são mostrados na Figura 6.12, onde se observa que o sistema estabiliza em torno de 4 min.

Já a Figura 6.13 exibe a sensibilidade ao pH calculada a partir da variação do pH tampão fosfato 10 mM. Observa-se, pela Figura 6.13 que quando o ITO está recoberto com as bicamadas PPID/Tirosinase, a sensibilidade cai 40% (de aproximadamente 57 mV.pH^{-1} para aproximadamente 34 mV.pH^{-1}). Este fato está relacionado com o bloqueio dos sítios de ligação da superfície do óxido (ITO). Antes da automontagem, mais sítios de ligação estavam disponíveis. Com a funcionalização (automontagem), apesar de o PPID ser uma estrutura porosa, o mesmo não acontece com o extrato bruto de tirosinase, que ainda pode conter diversas impurezas, o que dificulta a difusão dos íons H^+ até o substrato de ITO, parte do sistema sensível ao pH.

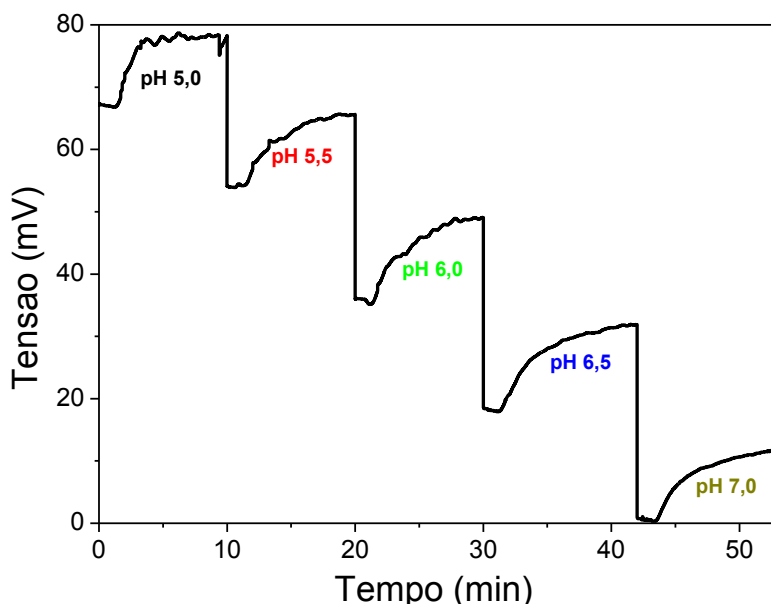


Figura 6.12 – Resposta típica ao pH dos filmes de ITO funcionalizados com 5 bicamadas de PPID/Tirosinase. Condições experimentais: temperatura 25°C , tampão fosfato 10 mM com pHs 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 e 7.0.

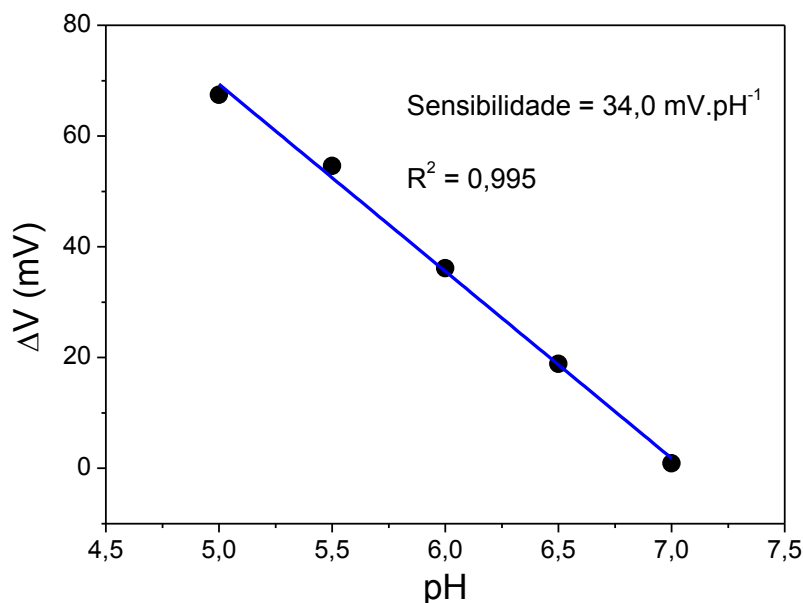


Figura 6.13 – Sensibilidade ao pH dos filmes de ITO funcionalizados com 5 bicamadas de PPID/Tirosinase à temperatura de 25°C.

Sabe-se que a atividade enzimática é estritamente dependente de algumas condições, como por exemplo, temperatura, concentração salina e pH. No caso da tirosinase purificada a partir do cogumelo, o valor de pH ótimo para a enzima está compreendido entre 6 a 7, segundo a empresa Sigma Aldrich (69). Visando melhorar o ambiente de medida, a voltagem de saída foi medida em um intervalo de pH de 5,5 a 7 para uma mesma concentração de fenol. Observa-se que o sinal do biossensor aumenta com o pH alcançando seu máximo em 6,5. Esse comportamento em relação ao pH está em ótima concordância com a valor esperado para a enzima pura enzima pura (69).

É esperado alterações de pH mais favoráveis em tampões com baixa força iônica, devido à grande mobilidade de H^+ na solução. Porém, tendo em vista que o circuito do biossensor se fecha através da solução, uma força iônica mínima é necessária para seu bom funcionamento. Em outras palavras, a solução eletrolítica atua como chave no circuito do biossensor. Ainda, um tampão com uma força iônica menor poderia não manter o pH do sistema de medida constante, o que aumentaria o erro nas medidas subsequentes com o

aumento da concentração de fenol e catecol. Portanto, determinaram-se as condições experimentais como sendo pH 6,5 e tampão PBS 10 mM.

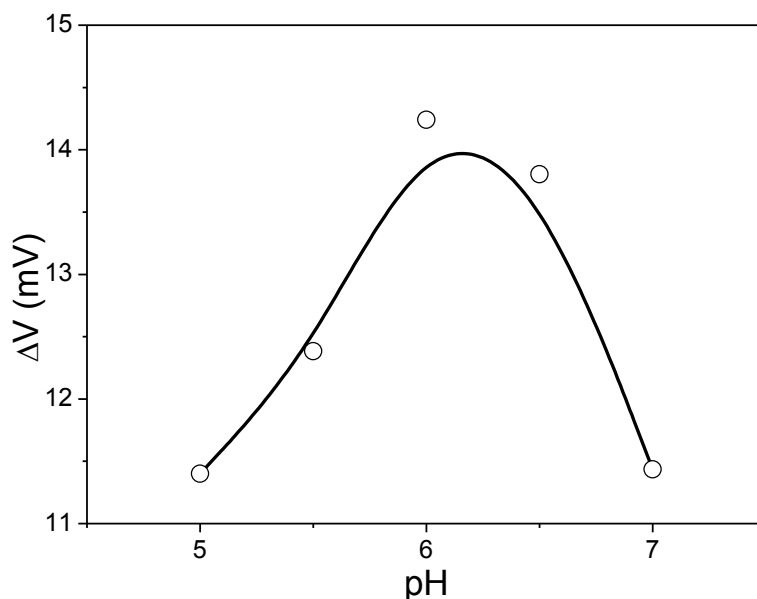


Figura 6.14 – Influência do valor do pH na resposta do biossensor ITO-PPID/Tirosinase frente à adição de 0,5 mM de fenol no béquer de medida.

6.5.3 ANÁLISE DO BIOSENSOR

Na presença de fenol, a tirosinase catalisa a reação descrita esquematicamente na Figura 4.6, ou seja, consumindo oxigênio molecular (O_2). Logo, pode-se inferir que parte desse oxigênio é oriundo de moléculas de água presentes na solução analítica. Dessa forma, o biossensor potenciométrico é sensível a alterações locais de pH, pois é capaz de detectar variações na concentração de íons H^+ (Figuras 6.7 e 6.12) que ocorrem de acordo com o prosseguimento da reação catalisada pela tirosinase.

A Figura 6.15 mostra a resposta típica do biossensor ITO-PPID/Tirosinase após a adição 0,5 mM de fenol na solução analítica. Foi observado um tempo de resposta de aproximadamente 540 s, valor em excelente concordância com biossensor para detecção de

clorofenol utilizando ISFETs convencionais como transdutores (70). O valor da tensão no tempo de resposta foi utilizado para obtenção da curva de calibração do biossensor (tensão de saída do dispositivo em função da concentração de analito), como mostrado na Figura 6.16 para o fenol e 6.17 para o catecol.

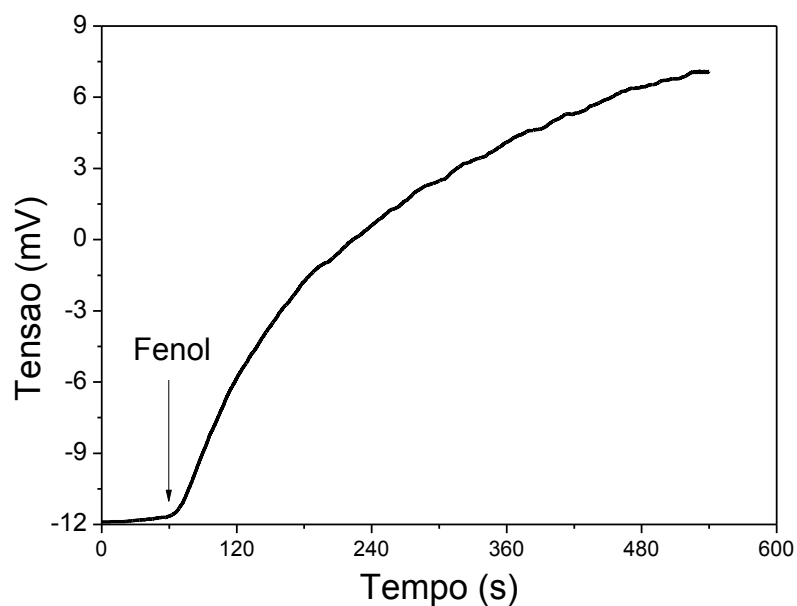


Figura 6.15 – Resposta típica do biossensor ITO-PPID/Tirosinase frente à adição de 0,5 mM de fenol na solução analítica. Condições experimentais: tampão fosfato 10 mM, pH 6.5, temperatura de 25°C.

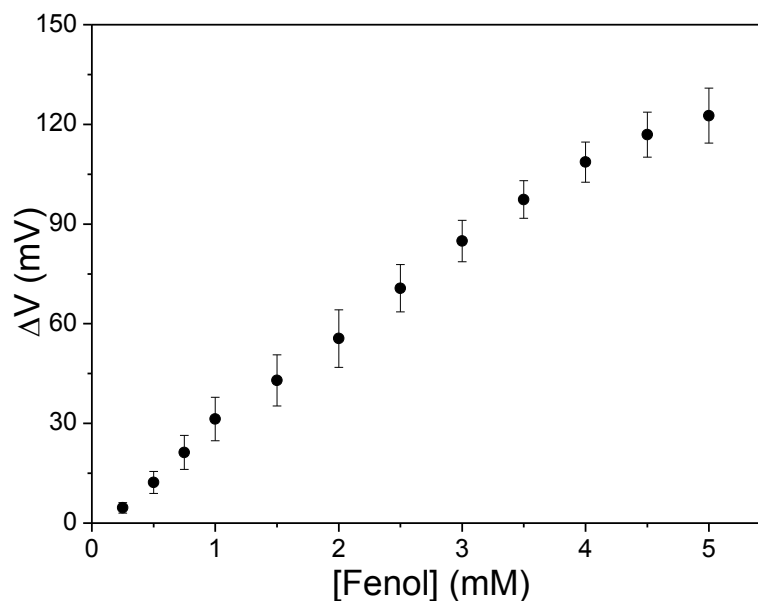


Figura 6.16 – Resposta do biossensor ITO-PPID/Tirosinase frente às adições de fenol (Hidroxibenzeno). Condições experimentais: tampão fosfato 10 mM, pH 6.5.

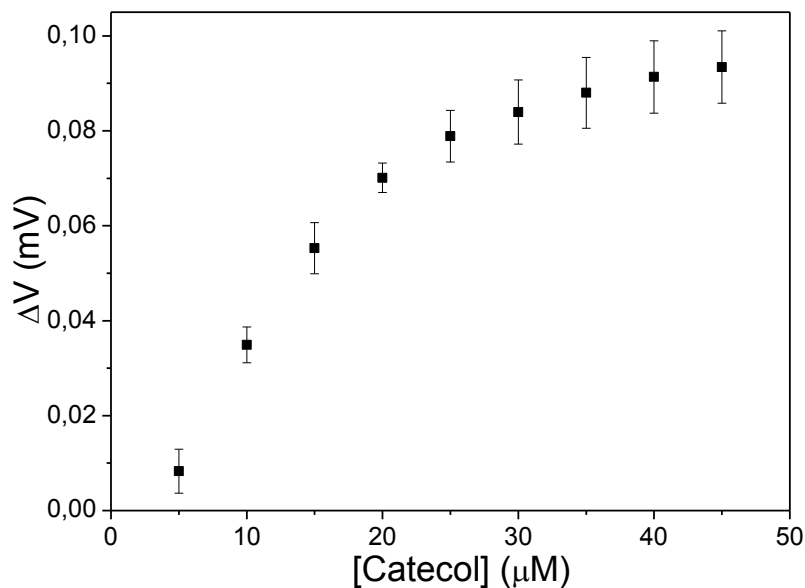


Figura 6.17 – Curva analítica do biossensor ITO-PPID/Tirosinase frente a adições de catecol. Condições experimentais: tampão fosfato 10 mM, pH 6.5.

A sensibilidade do biossensor foi calculada a partir da região linear nas curvas das 6.17 (para o fenol) e 6.18 (para o catecol). O valor encontrado foi de $(29,0 \pm 1) \text{ mV.mM}^{-1}$ e $(4,0 \pm 0,5) \text{ mV.}\mu\text{M}^{-1}$, para o fenol e o catecol, respectivamente. O valor encontrado para o fenol, é cerca de 7 vezes maior que os valores encontrados na literatura para sistemas semelhantes (70), indicando que a técnica de automontagem é viável para a imobilização de enzimas, as quais mantêm sua atividade após a imobilização.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Filmes de ITO foram funcionalizados com multicamadas de PPID-G3 e tirosinase, esta obtida a partir do extrato bruto do abacate. Estes filmes foram utilizados como biossensores potenciométricos baseados em dispositivos de alta impedância de entrada para detecção de fenol e catecol. O sistema em questão apresentou sensibilidade a variações de fenol e catecol em um intervalo, com uma sensibilidade a compostos fenólicos de $(29,0 \pm 1)$ mV.mM⁻¹ e $(4,0 \pm 0,5)$ mV.μM⁻¹, para o fenol e o catecol, respectivamente.

O extrato bruto do abacate se mostrou viável como fonte alternativa de tirosinase, uma vez que o mesmo apresenta um razoável constante de Michaelis-Menten para o analito catecol ($K_m = 5,14$ mM). Abrindo caminho para a obtenção de biossensores de baixo custo.

Os substratos comerciais de ITO apresentaram excelente sensibilidade a variações de pH (~ 57 mV.pH⁻¹) e quando funcionalizados como o sistema automontado PPID/Tirosinase, a sensibilidade sofre um decréscimo em virtude de efeitos de difusão iônica

Contudo, algumas etapas não menos importantes das que aqui foram apresentadas, necessitam ser estudadas e analisadas cuidadosamente. Tais etapas, se não foram incluídas no trabalho devido ao binômio tempo e instrumentação, espera-se que as mesmas sejam estudadas em futuramente. Assim seguem algumas sugestões para trabalhos futuros:

- ✓ Testar outros derivados fenólicos e comparar com os resultados com essa dissertação;
- ✓ Verificar o tempo de vida útil da enzima imobilizada;

- ✓ Testar a tirosinase retirada de outras fontes, tais como: batata, inhame, casca de banana, e utilizar o mesmo sistema de medida;
- ✓ Testar o biossensor em amostras reais, como a água de rios, onde há indústrias próximas;
- ✓ Criar biossensores miniaturizados para testes em tempo real.

Finalmente, espera-se que o presente trabalho possa ter despertado a necessidade do desenvolvimento de biossensores em nosso país a nível industrial, uma vez que sistemas inteligentes para o monitoramento de substâncias de interesse clínico e ambiental apresentam um elevado potencial de crescimento mercadológico.

REFERÊNCIAS

- 1 CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. COMPARISON OF THE ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF SOME ACID-PHENOLS - STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIP. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n.2, p. 324-325, 1992.
- 2 ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos Fenólicos em Alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p. 232 - 240, 2007.
- 3 AGENCY, U. S. E. P.; ASSOCIATES, C.; CORPORATION, S. R.; SUBSTANCES, U. S. A. F. T.; REGISTRY, D. **Toxicological profile for phenol**: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1989.
- 4 PEIXE, T. S.; NASCIMENTO, E. D. S.; DELLA ROSA, H. V. Determinação de fenol urinário por cromatografia em fase gasosa em trabalhadores que utilizam resinas fenólicas em fundições. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 279-287, 2006.
- 5 FENOL. UNESP, 2004. Informações de segurança sobre produtos químicos. Disponível em: <http://www.qca.ibilce.unesp.br/prevencao/produtos/fenol.html>. Acesso em 05/01/2012.
- 6 CHRISWELL, C. D.; CHANG, R. C.; FRITZ, J. S. Chromatographic determination of phenols in water. **Analytical Chemistry**, v. 47, n.8, p. 1325-1329, 1975.
- 7 COMMINS, B. T.; LINDSEY, A. J. The determination of phenols by chromatography and spectrophotometry of their methyl ethers: Ultraviolet absorption spectra of methyl aryl ethers in cyclohexane. **Analytica Chimica Acta**, v. 15, p. 446-450, 1956.

- 8 BUERK, D. G. **Biosensors: theory and applications**. Technomic Pub. Co., 1993. 221 p.
- 9 THEVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, n.1-2, p. 121-131, 2001.
- 10 RUSMINI, F.; ZHONG, Z.; FEIJEN, J. Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips. **Biomacromolecules**, v. 8, n.6, p. 1775-1789, 2007.
- 11 VIEIRA, N. C. S., **Biossensores de Glicose Nanoestruturados Baseados em Dendrímeros PAMAM e Filmes Finos de In₂O₃:Sn**. 2006. p. 121. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá 2006.
- 12 AI, H.; JONES, S. A.; LVOV, Y. M. Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 39, n.1, p. 23-43, 2003.
- 13 FERREIRA, M.; FIORITO, P. A.; OLIVEIRA, O. N.; DE TORRESI, S. I. C. Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 19, n.12, p. 1611-1615, 2004.
- 14 ZHAO, H. T.; JU, H. X. Multilayer membranes for glucose biosensing via layer-by-layer assembly of multiwall carbon nanotubes and glucose oxidase. **Analytical Biochemistry**, v. 350, n.1, p. 138-144, 2006.
- 15 AMEER, Q.; ADELOJU, S. B. Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 140, n.1, p. 5-11, 2009.
- 16 LIGLER, F. S.; TAITT, C. A. R. **Optical biosensors: present and future**. Elsevier Science. 1 ed. 2002. 616 p.

- 17 LEC, R. M. **Piezoelectric biosensors: recent advances and applications** (Ed.). *Frequency Control Symposium and PDA Exhibition, 2001. Proceedings of the 2001 IEEE International*,2001. p. 419-429.
- 18 KWONG, W. K. **Catalytic biosensors: novel analytical tools and their applications in sports, food and environmental monitoring**. Hong Kong University of Science and Technology, 2000.
- 19 ROGERS, K. R.; MULCHANDANI, A. **Affinity biosensors: techniques and protocols**: Humana Press, 1998. 249 p.
- 20 EVANS, A.; JAMES, A. M.; ACOL, **Potentiometry and ion selective electrodes**: Published on behalf of ACOL, Thames Polytechnic, London, by Wiley, 1987.
- 21 ROBERT, K. Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 599, n.1, p. 7-15, 2007.
- 22 BERGVELD, P. Development of an Ion-Sensitive Solid-State Device for Neurophysiological Measurements. **Biomedical Engineering, IEEE Transactions on**, v. BME-17, n.1, p. 70-71, 1970.
- 23 BERGVELD, P. Development, Operation, and Application of the Ion-Sensitive Field-Effect Transistor as a Tool for Electrophysiology. **Biomedical Engineering, IEEE Transactions on**, v. BME-19, n.5, p. 342-351, 1972.
- 24 BERGVELD, P. Thirty years of ISFETOLOGY - What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 88, n.1, p. 1-20, 2003.

- 25 DZYADEVYCH, S. V.; SOLDATKIN, A. P.; KORPAN, Y. I.; ARKHYPOVA, V. N.; ELSKAYA, A. V.; CHOVELON, J. M.; MARTELET, C.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Biosensors based on enzyme field-effect transistors for determination of some substrates and inhibitors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n.3, p. 496-506, 2003.
- 26 VANDERSPIEGEL, J.; LAUKS, I.; CHAN, P.; BABIC, D. THE EXTENDED GATE CHEMICALLY SENSITIVE FIELD-EFFECT TRANSISTOR AS MULTI-SPECIES MICROPROBE. **Sensors and Actuators**, v. 4, n.2, p. 291-298, 1983.
- 27 CHI, L. L.; CHOU, J. C.; CHUNG, W. Y.; SUN, T. P.; HSIUNG, S. K. Study on extended gate field effect transistor with tin oxide sensing membrane. **Materials Chemistry and Physics**, v. 63, n.1, p. 19-23, 2000.
- 28 FERNANDES, E. G. R.; VIEIRA, N. C. S.; DE QUEIROZ, A. A. A.; GUIMARÃES, F. E. G.; ZUCOLOTTO, V. Immobilization of Poly(propylene imine) Dendrimer/Nickel Phtalocyanine as Nanostructured Multilayer Films To Be Used as Gate Membranes for SEGFET pH Sensors. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 114, n.14, p. 6478-6483, 2010.
- 29 VIEIRA, N. C. S.; FIGUEIREDO, A.; DE QUEIROZ, A. A. A.; ZUCOLOTTO, V.; GUIMARÃES, F. E. G. Self-Assembled Films of Dendrimers and Metallophthalocyanines as FET-Based Glucose Biosensors. **Sensors**, v. 11, n.10, p. 9442-9449, 2011.
- 30 YIN, L. T.; CHOU, J. C.; CHUNG, W. Y.; SUN, T. P.; HSIUNG, S. K. Study of indium tin oxide thin film for separative extended gate ISFET. **Materials Chemistry and Physics**, v. 70, n.1, p. 12-16, 2001.
- 31 VIEIRA, N. C. S.; FERNANDES, E. G. R.; FACETO, A. D.; ZUCOLOTTO, V.; GUIMARÃES, F. E. G. Nanostructured polyaniline thin films as pH sensing membranes in FET-based devices. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 160, n.1, p. 312-317, 2011.
- 32 DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. **Science**, v. 277, n.5330, p. 1232-1237, 1997.

- 33 LVOV, Y.; ARIGA, K.; ICHINOSE, I.; KUNITAKE, T. Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n.22, p. 6117-6123, 1995.
- 34 ILLER, R. K. Multilayers of colloidal particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 21, n.6, p. 569-594, 1966.
- 35 DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, v. 210-211, n.Part 2, p. 831-835, 1992.
- 36 LVOV, Y.; HAAS, H.; DECHER, G.; MOEHWALD, H.; KALACHEV, A. Assembly of polyelectrolyte molecular films onto plasma-treated glass. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n.49, p. 12835-12841, 1993.
- 37 LVOV, Y.; DECHER, G.; MOEHWALD, H. Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine). **Langmuir**, v. 9, n.2, p. 481-486, 1993.
- 38 LOJOU, É.; BIANCO, P. Quartz crystal microbalance and voltammetry monitoring for layer-by-layer assembly of cytochrome c3 and poly(ester sulfonic acid) films on gold and silver electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 557, p. 37-47, 2003.
- 39 DECHER, G.; LEHR, B.; LOWACK, K.; LVOV, Y.; SCHMITT, J. New nanocomposite films for biosensors: layer-by-layer adsorbed films of polyelectrolytes, proteins or DNA. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 9, n.9-10, p. 677-684, 1994.
- 40 LIU, Y.; ERDMAN, A. G.; CUI, T. Acetylcholine biosensors based on layer-by-layer self-assembled polymer/nanoparticle ion-sensitive field-effect transistors. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 136, n.2, p. 540-545, 2007.

- 41 CARUSO, F.; NIIKURA, K.; FURLONG, D. N.; OKAHATA, Y. Assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for immunosensing 2. **Langmuir**, v. 13, n.13, p. 3427-3433, 1997.
- 42 LEHNINGER, A. L.; LEE, N. D.; COX, M. M.; SIMÕES, A. A.; LODI, W. R. N. **Princípios de bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.
- 43 FISCHER, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 27, n.3, p. 2985-2993, 1894.
- 44 *Enzimas 2*. USP. 2012. Departamento de Ciências Biológicas. Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/Enzimas2.htm>. Acesso em: 05/01/2012.
- 45 KOSHLAND, D. E. APPLICATION OF A THEORY OF ENZYME SPECIFICITY TO PROTEIN SYNTHESIS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 44, n.2, p. 98-104, 1958.
- 46 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*). **Química Nova**, v. 26, p. 197-201, 2003.
- 47 RICHARD-FORGET, F. C.; GAUILLARD, F. A. Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins, and 4-Methylcatechol in Model Solutions by Combinations of Pear (*Pyrus communis* Cv. Williams) Polyphenol Oxidase and Peroxidase: A Possible Involvement of Peroxidase in Enzymatic Browning†. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n.7, p. 2472-2476, 1997.
- 48 ALFRED M, M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, v. 67, n.21, p. 2318-2331, 2006.
- 49 BOUCHILLOUX, S.; MCMAHILL, P.; MASON, H. S. The multiple forms of mushroom tyrosinase. Purification and molecular properties of the enzymes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 238, p. 1699-707, 1963.

- 50 TIROSINASE. 2004. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Tirosinase>. Acesso em: 05/01/2012.
- 51 SIGNORI, C. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Biossensor Amperométrico para Determinação de Fenóis Usando um Extrato Bruto de Inhame (*Alocacia Macrorrhiza*). **Química Nova**, v. 17, n.1, p. 5, 1994.
- 52 WIJESURIYA, D. C.; RECHNITZ, G. A. Biosensors based on plant and animal tissues. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 8, n.3-4, p. 155-160, 1993.
- 53 FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. D. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, p. 455-464, 2002.
- 54 BARIOTO, V. D. C. R. **Influência do contra-íon usado na eletrossíntese do polipirrol em sua resposta como biossensor eletroquímico após a imobilização da polifenol oxidase**. 2009. p. 73 Dissertação de mestrado - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- 55 GRANQVIST, C. G.; HULTÅKER, A. Transparent and conducting ITO films: new developments and applications. **Thin Solid Films**, v. 411, n.1, p. 1-5, 2002.
- 56 FANG, A. P.; NG, H.; SU, X. D.; LI, S. F. Y. Soft-lithography-mediated submicrometer patterning of self-assembled monolayer of hemoglobin on ITO surfaces. **Langmuir**, v. 16, n.12, p. 5221-5226, 2000.
- 57 FANG, A.; NG, H.; LI, S. F. Y. Anchoring of Self-Assembled Hemoglobin Molecules on Bare Indium-Tin Oxide Surfaces. **Langmuir**, v. 17, n.14, p. 4360-4366, 2001.

- 58 KIM, J. S.; GRANSTROM, M.; FRIEND, R. H.; JOHANSSON, N.; SALANECK, W. R.; DAIK, R.; FEAST, W. J.; CACIALLI, F. Indium-tin oxide treatments for single- and double-layer polymeric light-emitting diodes: The relation between the anode physical, chemical, and morphological properties and the device performance. **Journal of Applied Physics**, v. 84, n.12, p. 6859-6870, 1998.
- 59 DE BRABANDER-VAN DEN BERG, E. M. M.; MEIJER, E. W. Poly(propylene imine) Dendrimers: Large-Scale Synthesis by Heterogeneously Catalyzed Hydrogenations. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 32, n.9, p. 1308-1311, 1993.
- 60 DA CRUZ VIEIRA, I.; FATIBELLO-FILHO, O. Spectrophotometric determination of methyl dopa and dopamine in pharmaceutical formulations using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as enzymatic source. **Talanta**, v. 46, n.4, p. 559-564, 1998.
- 61 CHAI, M.; NIU, Y.; YOUNGS, W. J.; RINALDI, P. L. Structure and Conformation of DAB Dendrimers in Solution via Multidimensional NMR Techniques. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n.20, p. 4670-4678, 2001.
- 62 FAN, Y.; FLURKEY, W. H. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. **Phytochemistry**, v. 65, n.6, p. 671-678, 2004.
- 63 YANG, C.P.; FUJITA, S.; ASHRAFUZZAMAN, M. D.; NAKAMURA, N.; HAYASHI, N. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Pulp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n.7, p. 2732-2735, 2000.
- 64 DOGAN, S.; TURAN, Y.; ERTURK, H.; ARSLAN, O. Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.3, p. 776-785, 2005.
- 65 PAUL, B.; GOWDA, L. R. Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from the Seeds of Field Bean (*Dolichos lablab*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n.9, p. 3839-3846, 2000.

- 66 LIN, J.-L.; HSU, H.-Y. Study of Sodium Ion Selective Electrodes and Differential Structures with Anodized Indium Tin Oxide. **Sensors**, v. 10, n.3, p. 1798-1809, 2010.
- 67 YATES, D. E.; LEVINE, S.; HEALY, T. W. SITE-BINDING MODEL OF ELECTRICAL DOUBLE-LAYER AT OXIDE-WATER INTERFACE. **Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I**, v. 70, p. 1807-1818, 1974.
- 68 FUNG, C. D.; CHEUNG, P. W.; KO, W. H. A generalized theory of an electrolyte-insulator-semiconductor field-effect transistor. **Electron Devices, IEEE Transactions on**, v. 33, n.1, p. 8-18, 1986.
- 69 TYROSINASE FROM MUSHTOOM. 2012. Disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=pt&N4=T3824|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC. Acesso em: 05/01/2012.
- 70 ANH, T. M.; DZYADEVYCH, S. V.; SOLDATKIN, A. P.; DUC CHIEN, N.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; CHOVELON, J. M. Development of tyrosinase biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for phenols determination in water solutions. **Talanta**, v. 56, n.4, p. 627-634, 2002.
- 71 MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. Anllysys of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annu. Rev. Biochem.** v.70, p.437 - 473, 2001.
- 72 LEWIS, J.K.; WEI, J.; SIUZDAK G. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis. **Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley and Sons**, NY, 2000.
- 73 KLAJANERT, B.; BRYSZEWSKA, N. Dendrimers: properties and applications. **Acta Biochimica Polonica**, n. 48 (1), p. 199 - 208, 2001.
- 74 INOUE, K. Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers. **Progress in Polymer Science**, n. 25 p. 453-571, 2000.

- 75 TORALES, R. P.; VENDRUSCOLO, J. L.; HASS, L. I. R.; FERRI, N. L.; DEL PINO, F. A. B.; ANTUNES, P. L. A. Caracterização parcial do escurecimento enzimático pela polifenoloxidase em pêssegos das CV. Granada, Jade, Esmeralda e Maciel. **Revista brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 1, p. 241 - 244, 2004.