



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO À BASE DE
TIROSINASE APLICADO NA DETERMINAÇÃO DE
COMPOSTOS ORGÂNICOS EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS**

Autor: LUCAS FRANCO FERREIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. YAICO D. TANIMOTO DE ALBUQUERQUE

UBERLÂNDIA

- 2005 -



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO À BASE DE
TIROSINASE APLICADO NA DETERMINAÇÃO DE
COMPOSTOS ORGÂNICOS EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS**

Dissertação de mestrado apresentada à comissão de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

AUTOR: LUCAS FRANCO FERREIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. YAICO D. TANIMOTO DE ALBUQUERQUE

CURSO: QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ANALÍTICA

UBERLÂNDIA

- 2005 -

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- F383b Ferreira, Lucas Franco, 1981-
 Biossensor amperométrico à base de tirosinase aplicado na determinação de compostos orgânicos em amostras ambientais / Lucas Franco Ferreira. - 2005.
 86 f. : il.
- Orientadora: Yaico D. Tanimoto de Albuquerque.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.
 Inclui bibliografia.
1. Química - Teses. I. Albuquerque, Yaico D. Tanimoto de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU: 54



Programa de Pós Graduação em Química- MESTRADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

e-mail: cpgquimica@ufu.br

Fone/Fax: 3239-4385

ALUNO: LUCAS FRANCO FERREIRA

NÚMERO DE MATRÍCULA: 503145601

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ANALÍTICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

“Biossensor amperométrico à base de tirosinase aplicado na determinação de compostos orgânicos em amostras ambiental”

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. YAICO D. TANIMOTO DE ALBUQUERQUE

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Anfiteatro do Bloco X do Campus Santa Mônica no dia 28 de fevereiro de 2005 às 15:00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Prof^a. Dr^a. Yaico D. Tanimoto de Albuquerque
(Universidade Federal de Uberlândia)

Prof. Dr. Luiz Antônio Faria
(Universidade Federal de Uberlândia)

Prof. Dr. Lúcio Angnes
(Instituto de Química/USP/São Paulo)

Uberlândia, 28 de fevereiro de 2005.

***“UM HOMEM NUNCA DEVE ENVERGONHAR-SE POR RECONHECER
QUE SE ENGANOU, POIS ISSO EQUIVALE A DIZER QUE
HOJE É MAIS SÁBIO DO QUE ERA ONTEM”.***

(Jonathan Swift)

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido finalizado sem prestar minha homenagem a algumas pessoas, as quais julgo terem contribuído de algum modo, para o êxito alcançado:

- *A Deus pelo Dom da vida e por estar sempre comigo nos momentos mais difíceis.*
- *Aos meus queridos pais Adail e Devanir e meu irmão Diogo pela confiança, dedicação e desempenho demonstrado durante todos esses anos de luta.*
- *À minha querida esposa Marisa e meu filho Carlos Augusto pelo companheirismo, dedicação, paciência e também por sempre acreditarem em mim.*
- *À minha avó Francisca Fernandes (In memorian) pelo incentivo e exemplo de luta, minha eterna gratidão.*
- *À minha orientadora Prof^{ta}. Dra. Yaico D. Tanimoto de Albuquerque pela orientação, oportunidades e apoio durante a execução deste trabalho demonstrando sempre uma sincera dedicação, amizade, confiança e paciência.*
- *Em especial aos grandes amigos e colegas de laboratório: Débora Vilela, Leonardo Moraes, Maria Madalena, Trajano, Keila Rezende, Marina Medeiros, Grazielle Borges, Delaine Eurípedes, Webert Martins, José Gonçalves, Débora Gontijo, Aline Rodrigues, Fábio Vilela, Daniel Tizo, Eduardo Franca, Luciene e Luciana, Rodrigo Braghiroli, Mário Henrique, Wagner Santos, André (Casadinho), Karla Cravalho, Wallans Pio, Douglas Queiroz, Paula Safatle, Daniela Moraes, Thiago Padovani, Taísa Shimosakai, Betina Royer, e demais amigos pelos quais não são reportados nestas linhas.*
- *Aos meus tios, primos, padrinhos e demais companheiros que sempre torceram, mesmo à distância, para minha formação, meu obrigado.*
- *À amiga Isabel, secretária do Curso de Pós-Graduação em Química, pela paciência, colaboração e grande demonstração de amizade.*
- *Em especial aos Prof. Dr. Ana Graci Brito Madurro e Domingos Sávio de Miranda, pelas valiosas contribuições dadas à conclusão do trabalho.*
- *Aos membros da Banca pela aceitação e valiosas contribuições concedidas para o aprimoramento do trabalho desenvolvido.*
- *A CAPES pela concessão da bolsa de estudos, meu muito obrigado.*
- *Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pelo espaço físico concedido.*

Índice

p.

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	viii
Nomenclatura.....	ix
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO	1
1.1 – Considerações gerais.....	2
1.2 – Métodos de determinação de compostos fenólicos e inseticidas OF e CB	6
1.3 – Biossensores enzimáticos	8
1.4 – Objetivos	13
CAPÍTULO 2: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	14
2.1 – Reagentes utilizados	15
2.2 – Soluções utilizadas	16
2.3 – Preparação do transdutor amperométrico não-modificado.....	16
2.4 – Preparação do transdutor amperométrico modificado	17
2.6 – Preparação do eletrodo de referência/auxiliar – Ag/AgCl	18
2.7 – Medidas eletroquímicas	18
2.8 – Medidas da atividade enzimática.....	21
2.9 – Medidas da constante de Michaelis–Menten aparente (K_M^{app}) da enzima imobilizada e da enzima livre	22
2.10 – Medidas da taxa de inibição da enzima tirosinase	22

CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
3.1 – Investigações do comportamento eletroquímico do catecol sobre eletrodos de carbono	25
3.1.1 – Investigações empregando EPC e ECG não modificados	25
3.1.2 – Investigações empregando EPC–FtCo e ECG–FtCo	32
3.2 – Investigações realizadas com o biossensor amperométrico	39
3.2.1 – Características gerais do biossensor	39
3.2.2 – Investigação da oxidação do catecol envolvendo tirosinase imobilizada na superfície dos eletrodos ECG–FtCo	40
3.2.3 – Influência da temperatura no processo de catálise enzimática	42
3.2.4 – Resposta do biossensor em função do pH da solução tampão.....	45
3.2.5 – Resposta do biossensor em função da concentração do tampão fosfato	46
3.2.6 – Resposta do biossensor em função da concentração de catecol	47
3.2.7 – Determinação de K_M e I_{Max} da enzima imobilizada	49
3.2.8 – Avaliação da inibição da enzima tirosinase pelos inseticidas OF (Metil Paration, Diazinon) e CB (Carbaril e Carbofuran).....	51
CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	57
4.1 – Conclusões	58
4.2 – Propostas de continuidade.....	59
CAPÍTULO 5: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

RESUMO

FERREIRA, Lucas Franco, *Biossensor amperométrico à base de tirosinase aplicado na determinação de compostos orgânicos em amostras ambientais*. Uberlândia; Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2005. Dissertação de Mestrado.

Um biossensor amperométrico baseado na enzima tirosinase foi desenvolvido e investigado para o monitoramento dos agrotóxicos Metil Paration, Carbaril, Carbofuran e Diazinon. A enzima foi imobilizada sobre um eletrodo composto de grafite modificado com ftalocianina de cobalto (II) (ECG-FtCo) por *cross-linking* com glutaraldeído e albumina de soro bovino. Vários parâmetros que afetam a resposta do biossensor tirosinase para o catecol como substrato foram estudados.

A resposta do ECG-FtCo para o catecol foi investigada em termos do limite de detecção (LD), estabilidade e passivação do eletrodo pelos produtos poliméricos. Esses parâmetros foram comparados com aqueles obtidos com o eletrodo de pasta de carbono não modificado (EPC) e o eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto (II) (EPC-FtCo). O ECG-FtCo apresentou o maior LD para catecol, $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, este eletrodo apresentou a corrente residual voltamétrica baixa e mais estável com uma intensidade de corrente independente do tempo. A corrente residual voltamétrica manteve-se aproximadamente inalterada por 65 medidas de catecol contra duas a três medidas realizadas com outros eletrodos.

Vários parâmetros experimentais foram explorados para avaliar a melhor performance analítica do biossensor. O catecol foi determinado pela redução direta da *o*-quinona produzida enzimaticamente à $-0,20 \text{ V vs Ag/AgCl (KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1})$. Os resultados mostraram que as maiores respostas amperométricas eram encontradas em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,50. A faixa linear de resposta para o biossensor foi de $5,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para o catecol. A sensibilidade para catecol foi ao redor de $1,6 \times 10^{-5} \mu\text{A mol}^{-1} \text{ L}$.

A enzima imobilizada apresentou atividade específica ao catecol maior do que a apresentada pela enzima livre. A constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}) da enzima imobilizada foi 1,7 mM enquanto para a enzima livre foi 2,3 mM. Estudos de inibição foram realizados utilizando-se Metil Paration, Diazinon, Carbaril e Carbofuran, respectivamente. Nesse estudo, foi usada a diminuição da taxa da corrente de redução devido a *o-quinona* produzida para quantificar os pesticidas indiretamente. Todos os compostos mostraram uma dependência linear entre a concentração e a inibição relativa. Estudos de recuperação empregando as melhores condições foram realizados utilizando-se amostras de água *fortificadas* com os inibidores em níveis de 30 ppb, respectivamente. As recuperações variaram entre 93 % e 99 % com coeficientes de variação de 1,01 a 2,09 %.

Palavras Chave: biossensor amperométrico, enzima tirosinase, catecol, eletrodo de grafite compósito modificado, ftalocianina de cobalto (II).

ABSTRACT

FERREIRA, Lucas Franco, *Amperometric biosensor based on tyrosinase applied for the indirect determination of traces of pesticides*, Uberlândia; Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2005. Dissertação de Mestrado.

An amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme was developed and investigated for monitoring of Parathion Methyl, Carbaryl, Carbofuran and Diazinon. The enzyme was immobilized on a cobalt (II) phthalocyanine modified graphite composite electrode (CoPc-GCE) by cross-linking with glutaraldehyde and bovine serum albumin. Several parameters which affect the response of tyrosinase biosensor referring to catechol as substrate were examined.

The response of the CoPc-GE towards the catechol was investigated in terms of the detection limit (LOD), response stability and electrode fouling by the of polymeric oxidation products. These parameters were compared with the ones obtained with an unmodified carbon paste electrode (CPE) and a cobalt (II) phthalocyanine modified carbon paste electrode (CoPc-CPE). The CoPc-GCE exhibited the highest LOD to catechol, $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Additionally, this electrode exhibited a stable baseline and a time-independent current intensity. The intensity of the current was approximately unchanged for 65 catechol measurements against 2-3 measurements reported to the others electrodes.

Various experimental parameters were explored for optimum analytical performance of the biosensor. The catechol was determined by the direct reduction of biocatalytically liberated *o*-quinone at -0.20 V vs Ag/AgCl ($3.0 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$). The results showed that highest amperometric responses were found in 0.05 mol L^{-1} phosphate buffer with $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, and pH 6.50. The linear range for the reported biosensor was 5.0×10^{-5} a $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ for catechol. The sensitivity was ca. $1.6 \times 10^{-5} \mu\text{A mol}^{-1} \text{ L}$.

The immobilized enzyme yields specific activities to catechol higher than that of free enzyme. The apparent Michaelis-Menten constant (K_M^{app}) value of immobilized enzyme was 1.7 mM while that of soluble enzyme was 2.3 mM .

Inhibition studies were carried out by using Methyl Parathion, Diazinon, Carbaryl and Carbofuran, respectively. The decrease of the rate of reduction in the current due to produced *o*-quinone was used for evaluation. All four compounds showed a linear dependence between the concentration and the relative inhibition. Recovery studies employing the best conditions were carried out by using water samples *spiked* with the inhibitors at levels of 30 ppb, respectively. The recoveries ranged between 93 % and 99 % with coefficients of variation of 1.01 – 2.09 %.

Keywords: amperometric biosensor, tyrosinase enzyme, catechol, modified composite graphite electrode, cobalt (II) phtalocyanine.

Lista de Figuras

Figura 1: Estruturas (I) centro ativo da tirosinase e (II) molécula de histidina.....	9
Figura 2: Sítio ativo dinuclear de cobre para a enzima tirosinase.....	9
Figura 3: Ciclo catalítico da enzima tirosinase na oxidação de mono e difenóis à <i>o</i> -quinona na presença de oxigênio, baseado no modelo proposto por Duran et al. [48].....	11
Figura 4: Potenciostato/Galvanostato PAR 237 A.....	19
Figura 5: Esquema da célula de três eletrodos.....	20
Figura 6: Esquema da célula eletroquímica de três eletrodos utilizada na investigação da oxidação do catecol, pela enzima tirosinase imobilizada sobre o ECG-FtCo, em função do tempo de reação enzimática. Volume célula: 300 μ L.....	21
Figura 7: Voltamograma cíclico da solução de catecol $1,2 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ sobre EPC. Eletrólito suporte: H ₂ SO ₄ 0,05 mol L ⁻¹ . Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ . Eletrodo de trabalho: EPC.....	25
Figura 8: Variação do Ep _a (a) e do Ep _c (b) em função do pH da solução de catecol $1,2 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre EPC. Eletrólito suporte constituído de tampão citrato de sódio 0,10 mol L ⁻¹ , tendo o pH ajustado com solução de NaOH e H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ . Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	27
Figura 9: Gráficos de Ip _a e Ip _c em função da raiz quadrada da velocidade de varredura do potencial, obtidos de VC de solução de catecol $1,2 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em H ₂ SO ₄ 0,05 mol L ⁻¹ sobre EPC. Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	29

- Figura 10:** Gráfico de I_{pa} em função da concentração de catecol, utilizando H_2SO_4 0,05 mol L^{-1} como eletrólito suporte, sobre EPC. Velocidade de varredura: 50 $mV s^{-1}$ 30
- Figura 11:** Voltamogramas do EPC em H_2SO_4 0,05mol L^{-1} : (1) antes e (2) após a obtenção de três VCs de solução de catecol $1,2 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} . Velocidade de varredura de 50 $mV s^{-1}$ 31
- Figura 12:** Voltamogramas de eletrodo do EPC-FtCo (5% FtCo), em solução de H_2SO_4 0,05 mol L^{-1} , em função do número de ciclos de varredura de potencial. Velocidade de varredura 50 $mV s^{-1}$ 33
- Figura 13:** Voltamograma cíclico da solução de catecol (—) $5,6 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} sobre ECG-FtCo e (---) $1,2 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} sobre EPC. Eletrólito suporte H_2SO_4 0,05 mol L^{-1} . Velocidade de varredura 50 $mV s^{-1}$ 35
- Figura 14:** Voltamogramas da solução (—) eletrólito suporte H_2SO_4 0,05 mol L^{-1} (---) catecol $1,6 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} (—) catecol $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} sobre EPC-FtCo. Velocidade de varredura 50 $mV s^{-1}$ 35
- Figura 15:** Voltamogramas de EPC e ECG-FtCo (5%) em H_2SO_4 0,05mol L^{-1} : **(1)** EPC após obter 2 VCs de solução de catecol $1,1 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} e **(2)** ECG-FtCo eletrólito suporte **(3)** ECG-FtCo após obter 15 VCs de solução de catecol $1,1 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} . Velocidade de varredura de 50 $mV s^{-1}$ 36
- Figura 16:** Molécula de Ftalocianina de Co(II)..... 38
- Figura 17:** Esquema do funcionamento do biossensor amperométrico à base de tirosinase 39
- Figura 18:** Caminho de reação proposto para hidroxilação do fenol catalisada pela enzima tirosinase. E, enzima; M, fenol; D, catecol; BQ, *o*-benzoquinona; THB, 1,2,4-trihidroxibenzeno; HBQ, hidroxibenzoquinona [76]. 41

- Figura 19:** Variação de I_{pc} e I_{pa} em função do tempo da reação enzimática, obtidos para solução de catecol $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,50, em presença de enzima tirosinase imobilizada (60 U) sobre eletrodo ECG-FtCo. (A) consumo de catecol; (B) geração da *o*-quinona..... 43
- Figura 20:** VCs em função do tempo da reação enzimática. (A) consumo de catecol e (B) produção de quinona, obtidos para solução de catecol $2,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,50 em presença de enzima tirosinase livre (60 U), empregando-se o ECG-FtCo. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} 44
- Figura 21:** Resposta do biossensor amperométrico, obtida em $-0,2 \text{ V}$ vs Ag/AgCl (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em função do pH da solução tampão fosfato. Eletrólito: solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de catecol: $2,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 46
- Figura 22:** Resposta do biossensor amperométrico, obtida em $-0,2 \text{ V}$ vs Ag/AgCl (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em função da concentração da solução tampão fosfato, em pH 6,50, contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. [catecol] = $2,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 47
- Figura 23:** Resposta do biossensor amperométrico, em $-0,2 \text{ V}$ vs Ag/AgCl (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em função da concentração da solução de catecol, em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,50. (A) somente região linear (B) região completa até a saturação. 48
- Figura 24:** Gráfico de *Eadie-Hofstee* para obtenção da K_M da enzima tirosinase imobilizada. 50
- Figura 25:** Resposta de Inibição em função da concentração de Metil Paration. Média de três determinações. 53
- Figura 26:** Inibição em função da concentração dos inseticidas: (A) diazinon, (B) carbofuran e (C) carbaril. Média de três determinações. 54

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comparação dos eletrodos de carbono em termos do Limite de Detecção (LD) para catecol, n ^o de medidas realizadas e principais vantagens e desvantagens.....	37
Tabela 2: Principais características físico-químicas, estruturais e toxicológicas dos inseticidas selecionados para estudo.....	51
Tabela 3: Principais aplicações dos inseticidas selecionados para estudo.	52
Tabela 4: Faixa linear da % de Inibição e Limite de Determinação obtidos pelo biossensor amperométrico.	55

Nomenclatura

Letras Gregas

Ω - ohm – resistência elétrica

μ - Micro – 10^{-6}

λ - Comprimento de onda [nm]

v - Velocidade de varredura [mV s^{-1}]

ϕ_i - Diâmetro interno [mm]

Abreviações

[X] – Concentração do composto X

A – Amper

AchE – Enzima acetilcolinesterase

ASB – Albumina de Soro Bovino

CB – Inseticidas Carbamatos

CFs – Clorofenóis

CG – Cromatografia Gasosa

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

d – Densidade

E – Enzima

CE – Comissão Européia

ECG – Eletrodos Compósitos de Grafite

ECG-FtCo – Eletrodos Compósitos de Grafite/Celulose Modificados com Ftalocianina de
Co(II)

E_{deoxy} – Forma Intermediária Tirosinase

E_{met} – Forma Reduzida da Tirosinase

E_{oxy} – Forma Oxidada da Tirosinase

EPA – Agência de Proteção Ambiental Norte Americana

E_{pa} – Potencial de pico anódico

EPC – Eletrodos de Pasta de Carbono

E_{pc} – Potencial de pico catódico

EPC-FtCo – Eletrodos de Pasta de Carbono Modificados com Ftalocianina de Co(II)

ES – Complexo enzima-substrato

FtCo – Ftalocianina de Cobalto (II)

I – Corrente

I_{pa} – Corrente de pico anódica

I_{pc} – Corrente de pico catódica

K_M – Constante de Michaelis-Menten

LD – Limite de Detecção

OF – Inseticidas Organofosforados

P – Produto de Reação Enzimática

S – Substrato

Try – Enzima Tirosinase

U – Unidades de enzima

UV – Ultra-violeta

V – Volts

VC – Voltamograma Cíclico

CAPÍTULO 1:

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO

1.1 – Considerações gerais

Os principais problemas relacionados à poluição referem-se ao aumento da produção e utilização de produtos químicos, intensificados a partir da década de 1960. Essa demanda busca atender às exigências de uma sociedade de consumo ainda em expansão e pouco preocupada com os impactos ambientais causados pela produção industrial dos bens e produtos consumidos, como também pelos resíduos produzidos após a utilização dos mesmos. Nesse contexto, as agências de proteção ambiental desempenham um papel fundamental, cobrando uma atuação responsável da sociedade em geral, para a preservação da qualidade dos recursos naturais.

Dentre os recursos naturais, a água, além de essencial à vida no planeta, representa também, um fator decisivo para o desenvolvimento e bem estar da sociedade, tendo-se em vista a sua importância para diversas finalidades, tais como: alimentação e manutenção da vida humana, animal e vegetal, atividades domésticas, hospitalares e indústrias químicas, irrigação de áreas agrícolas e pecuária, geração de energia elétrica, entre muitos outros usos diretos e indiretos.

O uso intensivo de grandes quantidades de águas superficiais e subterrâneas para o desenvolvimento das atividades domésticas, industriais, agrícolas e pecuárias tem colocado esse recurso como um dos principais problemas a ser enfrentado nas próximas décadas. A contaminação dos recursos hídricos associada à sua escassez em muitas regiões no mundo justificam essa previsão alarmante [1].

A degradação e contaminação do solo e das águas superficiais e subterrâneas por esgotos domésticos e efluentes industriais não tratados, percolados líquidos produzidos de lixões e/ou em depósitos de resíduos sólidos tóxicos ou perigosos, dispostos de forma inadequada no solo, estão associadas ao desenvolvimento de várias doenças no homem e nos animais. São exemplos: a relação existente entre as disfunções do sistema nervoso e a presença do mercúrio; as doenças degenerativas dos ossos e o excesso de cádmio; os problemas neurológicos, reprodutivos e os diversos tipos de câncer associados a vários compostos orgânicos [2].

Dentre os poluentes/contaminantes orgânicos no solo e nos corpos d'água, encontram-se os compostos fenólicos, considerados indicadores dos referidos poluentes produzidos pelo homem, pois estão presentes em muitos efluentes de indústrias químicas destinadas à produção de resinas sintéticas, plásticos, borrachas, corantes, drogas, explosivos, solventes, removedores de tinta, indústrias de papel e celulose além de uma grande variedade de derivados aromáticos [3]. Os compostos fenólicos, quando não introduzidos nos corpos d'água por meio dos despejos de efluentes líquidos contaminados, podem ser formados durante a desinfecção da água de abastecimento com cloro, quando esta se encontra contaminada com compostos orgânicos. Os compostos fenólicos podem também originar-se da biodegradação de substâncias húmicas, taninos e ligninas [4].

Outra fonte de contaminação aquática é o uso dos compostos fenólicos na preservação de madeira, como pesticidas e herbicidas na agricultura, os quais podem também originar-se da degradação de herbicidas clorofenoxiácidos e de pesticidas organofosforados, principal rota responsável pela produção dos compostos cloro e nitro fenólicos [2,5,6,7]. Além da toxicidade, os compostos fenólicos, particularmente os clorofenóis, mesmo em concentrações menores que $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, podem afetar o gosto e o odor da água e dos peixes [8].

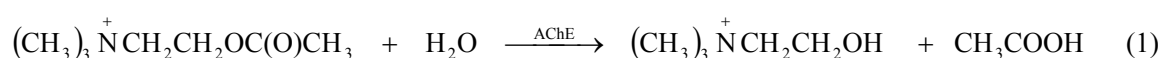
Muitos compostos fenólicos exercem efeitos tóxicos em animais e plantas, pois penetram facilmente pela pele e membranas celulares, determinando um amplo espectro de genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos hepatotóxicos, além de afetarem às velocidades das reações biocatalisadas nos processos de respiração e fotossíntese [8,9]. Assim, o fenol e especialmente seus derivados clorados, nitrados e alquilados têm sido definidos como poluentes perigosos devido à sua alta toxicidade e persistência no ambiente. Esses compostos estão presentes na lista de substâncias perigosas e potencialmente prejudiciais, segundo a Resolução CONAMA 20/86 [10]. Igual classificação é dada pela Comissão Européia [11] e pela Agência de Proteção Ambiental Norte Americana, EPA [7,12,13]. A Diretiva 80/778 da Comunidade Econômica Européia [6,14], por exemplo, determinou como concentração máxima permitida para fenólicos totais em água, o valor de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, para fenóis individuais. O Instituto Nacional Norte Americano para a

Saúde e Segurança Ocupacional estabeleceu como limites de exposição para fenol e isômeros do cresol, as concentrações de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ e de $2,3 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente [14]. No Brasil, a Resolução CONAMA 20/86 fixou os teores máximos desses compostos de acordo com a classificação das águas. Para as águas Classe 2 (destinadas ao abastecimento doméstico; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário; à irrigação de hortaliças e plantas frutíferas, a criação natural e/ou intensiva de espécies destinadas à alimentação humana), o limite máximo para fenóis totais é $1,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ e de $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para pentaclorofenol e 2,4,6 triclorofenol [10].

Embora muitos fenólicos apresentem toxicidade ao homem e animais, existem outros compostos congêneres, largamente encontrados na natureza, que desempenham importante papel como, por exemplo, os componentes naturais da madeira (lignina e tanino) e os responsáveis pelas propriedades organolépticas, antioxidantes e cores de muitas frutas e flores [15]. Os compostos fenólicos contribuem também para a qualidade dos alimentos e pelas propriedades anti-oxidantes de muitos sucos, vinhos, chás, frutas e vegetais.

Outra classe de compostos orgânicos, potencialmente tóxicos ao homem e demais organismos vivos são os inseticidas organofosforados (OF) e carbamatos (CB). Esses compostos são largamente usados no combate às pragas de várias culturas agrícolas, sendo também empregados, no controle de pragas domésticas e na saúde pública [16], na eliminação e controle de vetores, transmissores de enfermidades endêmicas. Muitos desses compostos, encontram aplicação, também, como armas químicas, sendo muito usados para fins militares [2,17]. Os inseticidas OF e CB são, de modo geral, mais tóxicos que os organoclorados, porém, bem menos persistentes no meio ambiente. Por serem mais reativos, podem ser rapidamente degradados pela ação da luz, pelo O_2 do ar ou por reação com a água, produzindo intermediários que, muitas vezes, são menos tóxicos que o composto de origem. Por outro lado, podem produzir outros mais tóxicos, como por exemplo, os derivados fenólicos tóxicos, sub-produtos da degradação de alguns OF no meio ambiente [18]. Devido à elevada toxicidade de muitos OF e CB sobre os seres humanos e animais, a exposição a esses produtos, por inalação, ingestão oral ou absorção através da pele pode levar à intoxicação aguda e/ou a sérios problemas de saúde [16]. No homem, causam lesões hepáticas e renais e graves

problemas ao sistema nervoso. A ação tóxica dos OF e CB ou de seus produtos de bio-transformação (ou da transformação ocorrida no meio ambiente) sobre os organismos está relacionada à inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), envolvida na transmissão dos impulsos nervosos para as células musculares e neuro-musculares nos organismos vivos [19]. A acetilcolina é o neurotransmissor responsável pela transmissão de estímulos entre as sinapses, o qual, na ausência de inibidores, sofre hidrólise catalisada pela enzima AChE, de acordo com:



O uso intensivo de grandes quantidades de OF e CB na agricultura, principalmente em monoculturas, deixam resíduos desses compostos nas plantas e no solo, os quais podem contaminar os alimentos e os mananciais de água. De acordo com a Resolução CONAMA 20/86, o nível de concentração máxima permitida para os pesticidas organofosforados e carbamatos totais em águas Classe 2, destinadas ao abastecimento público, é de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ em Paration [10].

Considerando-se os baixos níveis de tolerância, humana e animal, aos compostos fenólicos e inseticidas OF e CB, na forma nativa ou dos compostos derivados da transformação destes, é importante o desenvolvimento de metodologias rápidas para a detecção e determinação dos seus respectivos percentuais em alimentos, bem como nas matrizes ambientais, como no solo e corpos d'água, particularmente aquela usada para o consumo em geral. Esses métodos buscam, em geral, alcançar seletividade e sensibilidade suficientemente elevadas, tendo-se em vista as baixas concentrações dos compostos orgânicos tóxicos e a elevada complexidade das amostras, em termos de composição química, nas quais os mesmos se encontram.

Nesse contexto, a busca por métodos analíticos confiáveis, que atendam não somente aos requisitos de maior seletividade e menores limites de detecção, como também simplicidade, menor custo e rapidez da análise, constitui-se ainda uma área de pesquisa muito ampla e em expansão.

1.2 – Métodos de determinação de compostos fenólicos e inseticidas OF e CB

A maioria dos métodos desenvolvidos para a determinação dos compostos orgânicos anteriormente citados, em alimentos e matrizes ambientais, está baseada na cromatografia gasosa (CG) e na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A CG com detector de captura de elétron tem sido muito explorada na determinação de inseticidas OF [20,21], enquanto a CLAE é freqüentemente empregada para a determinação de CB [22,23,24] e compostos fenólicos [25,26,27,28].

Nesses métodos, devido à composição química complexa da amostra e aos níveis de concentração (da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$) em que se encontram os referidos compostos, estes são normalmente separados e concentrados numa etapa prévia à análise cromatográfica. A extração e a concentração constituem etapas importantes na referida determinação dos compostos orgânicos, pois possibilitam a eliminação dos interferentes, a separação e concentração dos compostos de interesse, para que alcancem os níveis de concentração detectados pela técnica CLAE. Essa etapa pode envolver vários procedimentos e consumir muito tempo da análise dependendo da seletividade e da sensibilidade do detector empregado na técnica cromatográfica.

O uso de detectores eletroquímicos tem contribuído para a maior exploração dos métodos CLAE na determinação de muitos compostos orgânicos tóxicos a níveis traço, pois esses detectores têm garantido maior seletividade e menores limites de detecção que os detectores UV normalmente utilizados [29]. Essas vantagens possibilitam que uma menor quantidade de amostra seja empregada, minimizando custos e reduzindo o número de etapas envolvidas na separação e concentração dos compostos. Apesar de poucos trabalhos encontrarem-se ainda descritos na literatura, sobre a determinação de inseticidas OF e CB por cromatografia líquida com detecção eletroquímica [27], essa técnica tem sido explorada na determinação dos derivados fenólicos, devido ao baixo custo dos detectores e por estes apresentarem também excelente reprodutibilidade e seletividade [30,31,32].

Embora a detecção eletroquímica apresente simplicidade e sensibilidade para a determinação de fenol e clorofenóis (CFs), essa detecção exige o uso de potenciais de

oxidação relativamente altos (700-900 mV *vs* Ag/AgCl), levando a muitas interferências, uma vez que as amostras contaminadas podem conter vários interferentes eletroativos. Outro problema relacionado à oxidação eletroquímica do fenol e derivados fenólicos é a tendência desses à eletropolimerização, que resulta na contaminação e passivação da superfície do eletrodo [33,34].

Assim, a imobilização de compostos na superfície dos eletrodos, que atuam como mediadores de reações de transferência de elétrons entre o eletrodo e o composto orgânico de interesse, representa uma alternativa interessante do ponto de vista analítico, pois possibilita a determinação de compostos que apresentam cinética de transferência de elétron muito lenta. A modificação da superfície de eletrodo de carbono vítreo mediante adsorção prévia de ftalocianinas de Co(II) foi utilizada por Mafatle & Nyokong [35], na determinação eletrocatalítica de fenol, 2-clorofenol e 4-clorofenol. A ftalocianina de Co(II) catalisa a oxidação dos referidos fenóis, levando a um aumento na corrente de oxidação eletroquímica e, o mais importante, promove também um aumento na estabilidade do eletrodo, devido à diminuição na formação de produtos que passivam a superfície do mesmo.

Os biossensores, representam outra alternativa aos métodos cromatográficos para a determinação dos compostos fenólicos e dos inseticidas OF e CB, devido às suas características únicas, como: seletividade, simplicidade, custo relativamente baixo de construção e estocagem, facilidade para miniaturização, automação e uso de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento “*on site*” rápido.

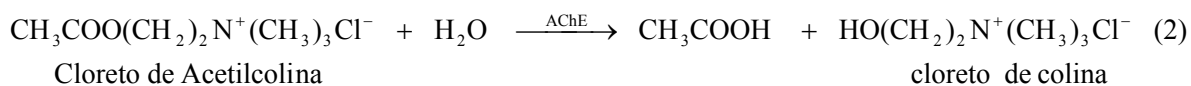
Um biossensor é definido como um dispositivo que combina a especificidade de um elemento biológico ativo, para um determinado analito ou substrato, com a sensibilidade de um transdutor, que converte o sinal biológico produzido num sinal elétrico, óptico, térmico, etc [36]. Os elementos de reconhecimento biológico podem ser enzimas, anticorpos, microorganismos, enquanto os transdutores podem ser os detectores eletroquímicos, óticos, acústicos, etc [37]. Dessa forma, uma grande diversidade de configurações de biossensores para aplicações ambientais foram desenvolvidas e encontram-se reportadas na literatura. Essa gama de configurações confere uma grande

versatilidade de biossensores, que podem ter aplicações diversas dependendo das características do elemento biológico e do transdutor utilizado. Assim, os biossensores, podem ser utilizados, como indicadores de toxicidade, quando os efeitos tóxicos provocados por determinados compostos sobre o elemento biológico (que pode ser uma bactéria), podem ser monitorados pelo transdutor.

Os biossensores apresentam vantagens sobre os métodos cromatográficos, pois, em geral, não estão sujeitos a interferentes da matriz, como os cromatográficos e apresentam menores limites de detecção. Sendo que, a maioria dos biossensores pode ser usada diretamente nos extratos da amostra, representando uma alternativa muito útil quando se deseja fazer o *screening* de uma grande quantidade de amostras. Por outro lado, tem-se a desvantagem de não discriminar os compostos presentes no extrato, que atuam como substratos ou inibidores do elemento biológico, presente no biossensor.

1.3 – Biossensores enzimáticos

Os biossensores podem apresentar aplicações mais específicas quando o elemento biológico apresenta especificidade para uma determinada classe de compostos, como, por exemplo, os biossensores baseados na enzima acetilcolinesterase (AChE), que indicam a presença de organofosforados e carbamatos [38,39,40,41,42]. O funcionamento desses biossensores, envolve a inibição da AChE, pelos referidos compostos, afetando a quantidade de ácido acético e de colina que são produzidos na hidrólise da acetilcolina:



A atividade específica da enzima, sobre um determinado composto (substrato) ou uma determinada classe de compostos, em geral, é responsável pelos inúmeros biossensores enzimáticos, propostos na literatura para a determinação de uma grande diversidade de compostos em matrizes diversas. Por exemplo, a enzima tirosinase tem sido

largamente explorada na preparação de biossensores eletroquímicos, visando a utilização destes na determinação de compostos fenólicos (substratos da tirosinase), em amostras biológicas, alimentos e amostras ambientais [6,43,44,45,46,47]. A tirosinase, também conhecida como polifenol oxidase, é uma enzima monooxigenase, contendo em sua forma oxigenada dois átomos de Cu(II), como sítios ativos, cada um coordenado a três moléculas de histidinas, sendo duas ligações equatoriais fortes e uma axial mais fraca, como ilustra a Figura 1 [48].

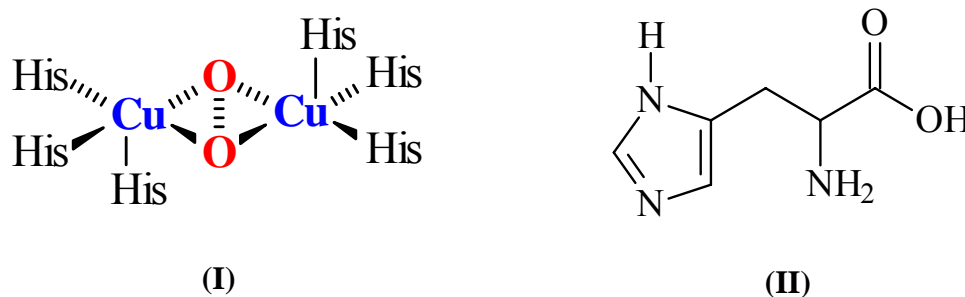


Figura 1: Estruturas (I) centro ativo da tirosinase e (II) molécula de histidina.

A estrutura tridimensional do sítio ativo da tirosinase, caracterizada por estudos espectroscópicos de Raios-X, pode ser melhor representada pela Figura 2.

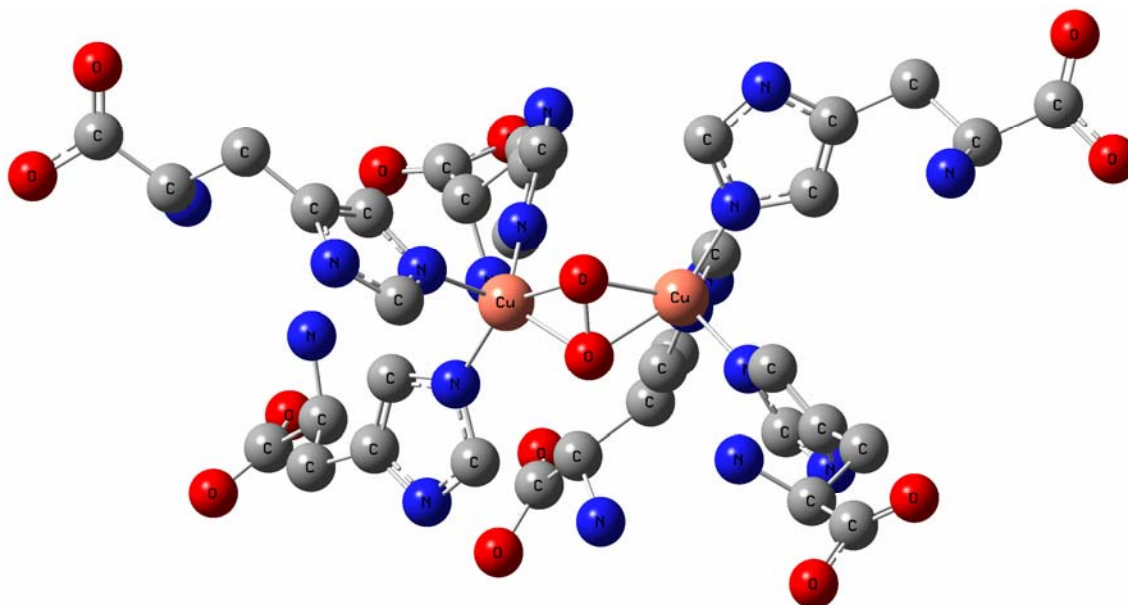


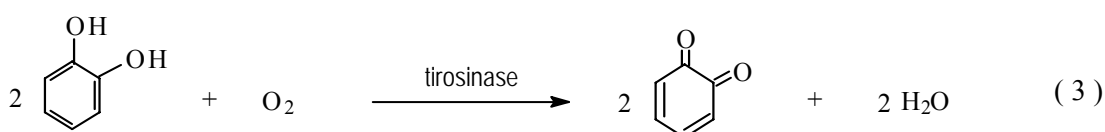
Figura 2: Sítio ativo dinuclear de cobre para a enzima tirosinase [49].

A tirosinase exerce papel fundamental na biosíntese da melanina, responsável pela pigmentação dos animais, pelas cores das frutas, flores e pelo escurecimento dos alimentos. Essa enzima catalisa duas diferentes reações: a orto-hidroxilação de monofenóis (L-tirosina) a *o*-difenóis (L-dopa), e a oxidação de *o*-difenóis às correspondentes *o*-quinonas (*o*-dopaquinona), ambas as reações utilizando-se oxigênio molecular [50].

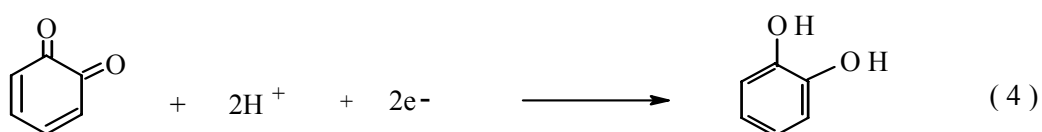
A atividade catalítica da enzima na oxidação de mono e difenóis envolve três formas da enzima: E_{oxy} , E_{deoxy} e E_{met} (Figura 3). Além da L-tirosina, existem outros substratos para a tirosinase como o catecol, o 4-metilcatecol, a dopamina e a noradrenalina, os quais, após a etapa de oxidação, podem experimentar ciclização, adição de nucleófilos ou reações de polimerização. O ciclo catalítico para a oxidação de mono e difenóis está ilustrado na Figura 3.

Os biossensores baseados na tirosinase têm sido também propostos para a determinação de pesticidas organofosforados e carbamatos totais em alimentos e diversas matrizes ambientais [51,52]. O funcionamento desses biossensores baseia-se na inibição da enzima pelos referidos compostos, na oxidação do substrato fenólico à correspondente *o*-quinona, em presença de O_2 dissolvido.

A reação de oxidação do catecol, catalisada pela enzima tirosinase, é representada pela equação 3, de modo simplificado [53]:



A maioria dos biossensores à base de tirosinase utilizam eletrodos de carbono como transdutores eletroquímicos, para a detecção e determinação da *o*-quinona produzida, que é reduzida eletroquimicamente ao respectivo composto fenólico, conforme a equação 4:



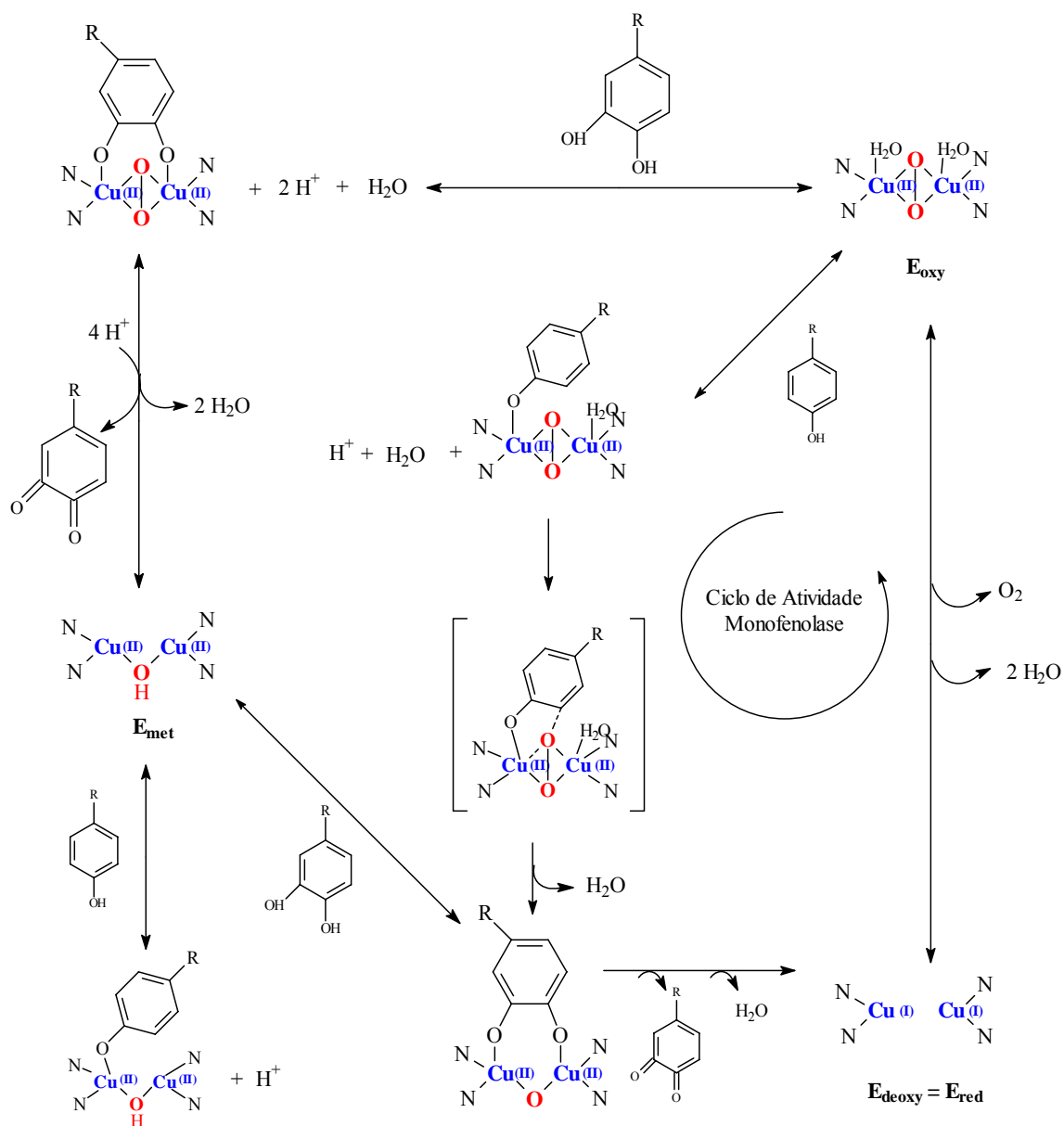


Figura 3: Ciclo catalítico da enzima tirosinase na oxidação de mono e difenóis à *o*-quinona na presença de oxigênio, baseado no modelo proposto por Duran et al. [48].

A quantidade da substância inibidora é proporcional à diminuição da quantidade de quinona produzida na reação enzimática. Esses biossensores utilizam, em geral, a detecção amperométrica da *o*-quinona, produzida sobre eletrodos de carbono, mantidos em potencial de 0,0 V vs Ag/AgCl.

A redução eletroquímica da quinona, formada na reação de oxidação do derivado fenólico, catalisada pela tirosinase, pode ocorrer com maior eficiência na presença de mediadores redox como $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ [54], tetracianoquinodimetano [55] e (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)₂(1,10-fenantrolina-5,6-dione) de ósmio [56]. A presença de mediadores redox contribui, também, para um maior tempo de vida e reprodutibilidade dos eletrodos de carbono utilizados na determinação de compostos fenólicos, pois minimizam a formação de produtos que passivam a superfície do eletrodo.

Os biossensores eletroquímicos, à base de tirosinase, podem ser preparados pela sua imobilização no eletrodo. Muitos métodos de imobilização da enzima têm sido propostos, como por exemplo, a incorporação da enzima em pasta de carbono [57], em eletrodos de grafite-resina epóxi [58] e a imobilização na superfície de carbono vítreo envolvendo *cross-linking* com glutaraldeído [59], em filme de polipirrol anfifílico [60], em crio-gel [61], em gel de poliácridamida [62], em polímeros redox [63], dentre outros.

A imobilização da enzima tirosinase, na superfície do eletrodo, por meio de *cross-linking* com glutaraldeído e albumina de soro bovino (ASB) é um procedimento bastante difundido [39,40,41]. A albumina é uma proteína inerte, que contém vários grupos amino (NH_2) livres, os quais podem realizar ligações de *cross-linking* com os grupos carbonila ($\text{C}=\text{O}$) do glutaraldeído para formar agregados macromoleculares, responsáveis pela imobilização da enzima e manutenção da atividade enzimática. A formação de ligações covalentes, entre os grupos NH_2 da enzima e o glutaraldeído, pode levar a mudanças na estrutura tridimensional da enzima, a qual é necessária para a devida eficiência catalítica, diminuindo, portanto, a sua atividade enzimática. Ivanov e colaboradores [39] propuseram o uso de vapor de glutaraldeído, que possibilita a imobilização de um filme de enzima, com alta atividade específica para o substrato. Por outro lado, Notsu & Tatsuma [51] obtiveram resultados muito satisfatórios para um biossensor desenvolvido, utilizando solução aquosa de glutaraldeído, para a realização do *cross-linking*.

Nesse contexto, o uso dos biossensores amperométricos à base de tirosinase no monitoramento de pesticidas OF e CB pode apresentar vantagens únicas, tais como: baixo custo, alta seletividade, alta sensibilidade, além de poderem ser descartáveis quando contaminados, eliminando, assim, as metodologias de reativação da enzima após determinado procedimento de análise.

1.4 – Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e investigar o uso de eletrodos de carbono modificados com ftalocianina de Co(II), como transdutor amperométrico de um biossensor à base de enzima tirosinase, para o monitoramento de inseticidas OF e CB em águas, solos e alimentos.

Os objetivos específicos consistiram em investigar a resposta do biossensor tirosinase utilizando-se catecol como substrato, mantendo-se o eletrodo num potencial constante para acompanhar a quantidade de substrato que é consumida (+ 0,6 V vs Ag/AgCl) ou de *o*-quinona que é produzida (- 0,2 V vs Ag/AgCl) na reação enzimática.

Otimizar a resposta do biossensor em função dos seguintes parâmetros: concentração de catecol, pH e concentração da solução tampão.

Determinar os parâmetros cinéticos do biossensor enzimático, com a finalidade de obter a constante de Michaelis-Menten, K_M , da enzima imobilizada comparando-a ao determinado para a enzima livre.

Aferir a taxa de inibição da resposta do biossensor ao catecol, na presença dos inseticidas Metil Paration e Diazinon (organosforados) e Carbaril e Carbofuran (carbamatos), buscando-se avaliar o uso desse biossensor na detecção dos referidos OF e CB em soluções aquosas.

CAPÍTULO 2:

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1 - Reagentes utilizados

- Acetona, Carlo Erba 99,5%, CH_3COCH_3 P.M. = 58,081
- Acetato de Celulose, SIGMA, C-3782
- Acetato de Sódio, Cinética Química, 99-101%, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, P.M. = 136,08
- Ácido Clorídrico, Reagen, 36,5-38%, HCl , $d = 1,19$, P.M. = 36,43
- Ácido Sulfúrico, Reagen, 95-98%, H_2SO_4 , $d = 1,84$, P.M. = 98,08
- Albumina de Soro Bovino, SIGMA, 99%, A-0281
- Carbaril, Riedel-de Haen, $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2$, P.M. = 201,22
- Carbofuran, Riedel-de Haen, $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_3$, P.M. = 221,25
- Catecol, Acros Organics, 99%, $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$, P.M. = 110,11
- Ciclohexanona, Vetec 99%, $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}$, P.M. = 98,14
- Citrato de Sódio, Reagen, 99-100%, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, P.M. = 294,11
- Cloreto de Potássio, Vetec, 99,5%, KCl , P.M. = 74,555
- Diazinon, Riedel-de Haen, $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$, P.M. = 304,34
- Hidrogenofosfato-dodecahidratado di-sódio Carlo Erba 98-102%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ P.M. = 358,14
- Ftalocianina de Cobalto (II), Strem Chemicals, CAS# [3317-67-7], P.M. = 571,47
- Glutaraldeído, Acros Organics, 50% em água, $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$, $d = 1,13$, P.M. = 100,12
- Grafite, Fluka, porosidade $\leq 0,1 \mu\text{m}$, EC – 2319553
- Hidróxido de Sódio, Reagen 97%, NaOH , lentilhas, P.M. = 40,00
- Metil Paration, Riedel-de Haen, $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{PSO}_5\text{N}$, P.M. = 263,30
- Dihidrogenofosfato de sódio-, Carlo Erba 98%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ P.M. = 137,99
- Tirosinase, SIGMA EC 1.14.18.1 from Mushroom, 3,8 g (25.000 U)

2.2 – Soluções utilizadas

Todas as soluções estoque foram preparadas com água deionizada ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, Milli-Q_{plus}), a partir de quantidades adequadas dos reagentes, grau PA. As soluções de trabalho foram preparadas a partir de seus respectivos estoques.

✓ *Solução estoque tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,50* - preparada dissolvendo-se 6,90 g de dihidrogenofosfato de sódio em aproximadamente 400 mL de água deionizada. Adicionou-se solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ para ajustar o pH em 6,50. O controle do pH foi realizado com potenciômetro - QUIMIS modelo Q-400-A. Após a correção do pH, completou-se o volume para 1,00 L.

✓ *Solução de Catecol $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$* - recém-preparada dissolvendo-se 0,0110 g do composto de grau PA, em 100 mL de solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

✓ *Solução de Albumina de Soro Bovino 1% (m/m)* - pesou-se 0,0100 g de albumina de soro bovino (ASB) e transferiu-se para um béquer. Adicionou-se então 1,00 mL de solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,50.

✓ *Solução de Glutaraldeído 2,5% (m/m)* - transferiu-se 0,05 mL de solução de glutaraldeído 50% para um balão volumétrico de 1 mL e completou-se o volume com água deionizada.

2.3 – Preparação do transdutor amperométrico não-modificado

✓ *Eletrodos de Pasta de Carbono (EPC)* - preparados pela mistura de 0,100 g de grafite puro (Fluka) em pó com 50 μL de óleo mineral em um almofariz de ágata, até completa homogeneização. A pasta obtida foi incorporada à extremidade inferior de um tubo de

vidro ($\phi_i = 0,6\text{mm}$), numa espessura de 1 mm, no interior do qual foi adaptado grafite ($\phi_i = 0,5\text{ mm}$) e fio de cobre, como contatos elétricos.

✓ ***Eletrodos Compósitos de Grafite (ECG)*** - constituídos por grafite e acetato de celulose. Preparados pela mistura de 97 mg de grafite puro (Fluka) com 320 μL de solução de acetato de celulose, conforme procedimento descrito por Skládal et al. [64]; a solução de acetato de celulose foi preparada pela mistura de 130 mg de acetato de celulose com 5 mL de acetona e 5 mL de ciclohexanona. E a suspensão foi pincelada sobre superfícies de policarbonato de CDs (área ativa de $1,0\text{ mm}^2$).

2.4 – Preparação do transdutor amperométrico modificado

➤ ***Eletrodos de pasta de carbono modificado com ftalocianina de Co(II) EPC-FtCo*** - preparados a partir da mistura de grafite puro e ftalocianina de Co(II), na proporção 92:5 (m/m), respectivamente, empregando-se 50 μL de óleo mineral como aglutinante; a pasta obtida foi incorporada à extremidade inferior de um tubo de vidro, conforme procedimento descrito para preparação do EPC.

➤ ***Eletrodos compósitos constituídos por grafite e celulose modificados com ftalocianina de Co(II) (ECG-FtCo)*** - preparados pela mistura de 92 mg de grafite puro e de 5 mg de ftalocianina de Co(II); o procedimento realizado foi o mesmo descrito para preparação do ECG, e a suspensão obtida foi pincelada sobre superfícies de policarbonato de CDs.

2.5 – Imobilização da enzima tirosinase sobre o ECG-FtCo

Antes da imobilização da enzima, os eletrodos foram submetidos a vários ciclos de varreduras de potencial, entre -0,4 a 1,2 V, em tampão fosfato, até a corrente residual atingir valor constante, da ordem de aproximadamente $1,00\text{ }\mu\text{A}$.

A imobilização da enzima foi realizada utilizando-se o procedimento descrito a seguir. Cerca de 25.000 U de tirosinase foram dissolvidas em 5,00 mL de solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ em pH 6,50 (3,80 mg de enzima dissolvida em 5,00 mL tampão fosfato). A uma alíquota de 100 µL desta solução estoque de enzima foram adicionados 100 µL de solução de albumina de soro bovino 1% (m/m), em tampão fosfato pH 6,50. Após cuidadosa agitação espalhou-se uma alíquota de 20 µL da solução final, contendo cerca de 60 U sobre a superfície do eletrodo compósito.

Após seco, adicionou-se sobre a superfície eletrodo-enzima, uma alíquota de 10 µL de solução de glutaraldeído 2,5%. Posteriormente os biossensores foram lavados com solução tampão fosfato e armazenados a 4 °C, no estado seco.

De acordo com a Comissão Internacional sobre Enzimas, uma unidade de enzima (U) é definida como a quantidade de enzima que causa a conversão de $1,0 \times 10^{-6}$ mol do substrato por minuto, em condições padronizadas, em pH ideal, à 30°C, em concentrações saturadas do substrato [65].

2.6 – Preparação do eletrodo de referência/auxiliar - Ag/AgCl

A eletrodeposição de AgCl sobre a superfície de uma lâmina de Ag metálica (5,0 mm x 7,0 mm) e de um fio de Ag (3,0 cm x 0,1 mm de diâmetro) foi realizada pela eletrólise da solução de NaCl 0,1 mol L⁻¹, sob corrente constante de 0,2 mA, durante 2 h, utilizando-se o Potenciostato/Galvanostato PAR-Modelo 273 A.

2.7 – Medidas eletroquímicas

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se o equipamento Potenciostato/Galvanostato da PAR-Modelo 273 A, conectado a um PC através de porta serial (Figura 4).

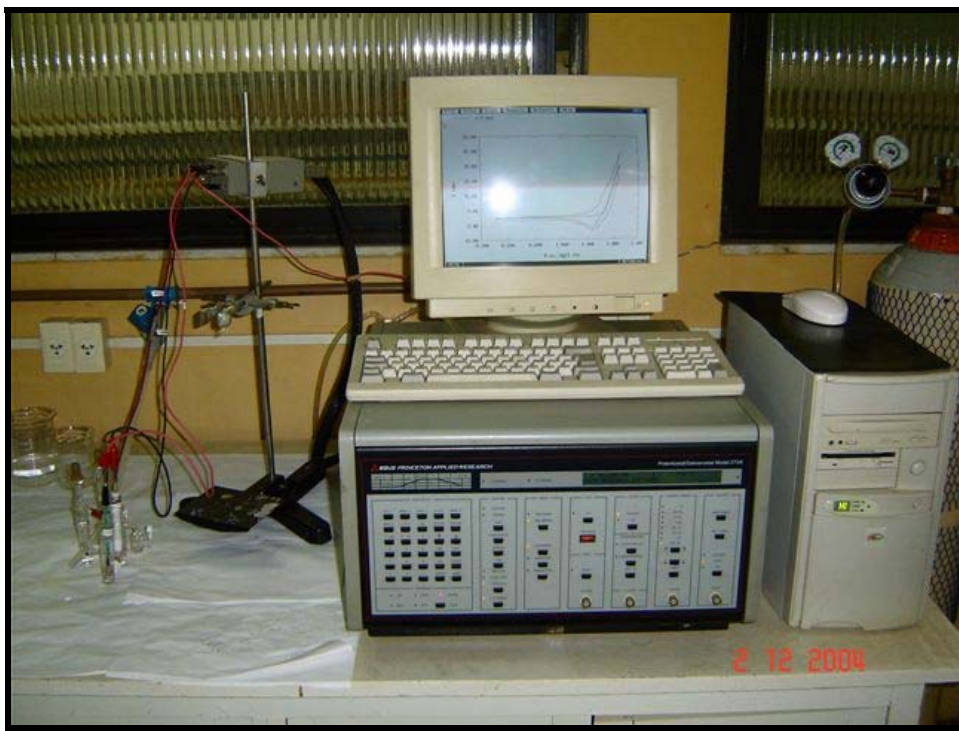


Figura 4: Potenciostato/Galvanostato PAR 237 A.

2.7.1 - Estudos do comportamento eletroquímico do catecol

Uma célula eletroquímica, constituída de um sistema de três eletrodos, ilustrada na Figura 5, com um volume de trabalho de 5,00 mL, foi empregada para estudos do comportamento eletroquímico do catecol sobre os eletrodos de trabalho.

Um eletrodo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e um fio de Pt foram utilizados como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente. Como eletrodos de trabalho foram investigados EPC, ECG, EPC-FtCo, ECG-FtCo com relação aos parâmetros como velocidade de varredura, pH da solução de eletrólito, concentração de catecol como também a estabilidade e a reprodutibilidade da resposta eletroquímica destes eletrodos, visando a escolha do melhor eletrodo para ser utilizado como transdutor amperométrico de biossensores a base de tirosinase. Como eletrólito suporte foi utilizada solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.



Figura 5: Esquema da célula de três eletrodos.

2.7.2 – Avaliação da reação enzimática envolvendo a enzima imobilizada sobre o ECG-FtCo

Uma célula eletroquímica constituída de um sistema de três eletrodos, ilustrada na Figura 6, com um volume de trabalho de 300 μL , foi empregada para investigar a resposta da enzima imobilizada no ECG-FtCo. Esse estudo foi realizado, monitorando-se as mudanças na quantidade de *o*-quinona produzida e de catecol consumido na reação enzimática envolvida no biossensor amperométrico.

A *o*-quinona foi detectada pela redução em $-0,2\text{ V}$ e o catecol por oxidação em $+0,6\text{ V}$. A detecção de ambos os compostos não se ocorreu pelo transdutor amperométrico do biossensor, mas sim por um outro ECG-FtCo, tendo Pt e fio de Ag/AgCl como eletrodos auxiliar e referência, respectivamente (Figura 6). Como eletrólito suporte foi utilizada solução tampão fosfato $0,05\text{ mol L}^{-1}$, KCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 6,50.

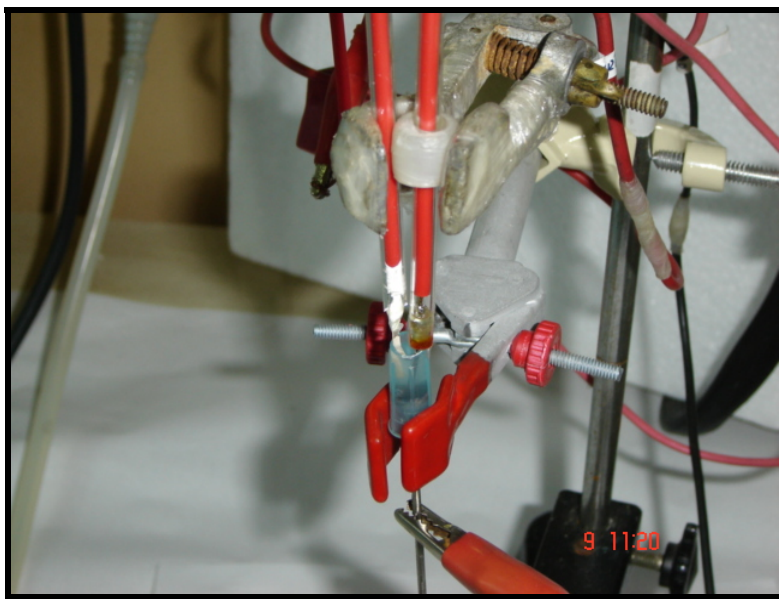


Figura 6: Esquema da célula eletroquímica de três eletrodos utilizada na investigação da oxidação do catecol, pela enzima tirosinase imobilizada sobre o ECG-FtCo, em função do tempo de reação enzimática. Volume célula: 300 μL .

2.8 – Medidas da atividade enzimática

A atividade da polifenol oxidase foi determinada medindo-se a variação de absorbância ($\lambda = 410 \text{ nm}$) da quinona, formada na reação enzimática. Nessa determinação foram usados 2,9 mL de solução de catecol $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,50) e 0,1 mL da solução estoque de enzima (contendo 500 U, segundo informação do frasco). Uma unidade de atividade (unidades mL^{-1}) é definida como quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto nas condições mencionadas [66].

As medidas de absorbância foram realizadas a cada 10 s, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e um espectrofotômetro da HP-Modelo 8453, interfaceado a um microcomputador Pentium. A temperatura foi mantida em 26°C e a solução foi mantida sob agitação constante.

Uma atividade de aproximadamente 3.200 U mL^{-1} foi obtida para a solução estoque da enzima.

2.9 – Medidas da constante de Michaelis-Menten aparente (K_M^{app}) da enzima imobilizada e da enzima livre

Foram realizadas medidas da corrente de redução devido a *o*-quinona produzida enzimaticamente em função da concentração de catecol, em $-0,2 \text{ V}$ vs Ag/AgCl, utilizando-se uma célula de três eletrodos, de $400 \mu\text{L}$. Como eletrodos auxiliar e referência, foram utilizados um fio de Pt e Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$), respectivamente. Como eletrodo de trabalho utilizou-se o ECG-FtCo, para a medida de K_M^{app} da enzima livre e o ECG-FtCo, contendo o filme de tirosinase, para a medida de K_M^{app} da enzima imobilizada. As soluções de catecol foram preparadas na faixa de $1,0 \times 10^{-5}$ a $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tendo como eletrólito tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,50. Nos experimentos realizados para a medida de K_M^{app} da enzima livre empregou-se à mesma quantidade de enzima, cerca de 60 U, na solução eletrólito. Em todos os experimentos, as medidas de corrente, foram realizadas em triplicatas, após 2 min do início da reação.

Os valores de K_M e I_{max} foram obtidos por meio do gráfico *Eadie-Hofstee* [67], utilizando-se o procedimento proposto por Cosnier & Innocent [68].

2.10 – Medidas da taxa de inibição da enzima tirosinase

Medidas da taxa de inibição pelos inseticidas organofosforados (metil paration e diazinon) e carbamatos (carbofuran e carbaril), foram conduzidas, medindo-se inicialmente a corrente de redução, em $-0,2 \text{ V}$, para a solução de catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,50, contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; em seguida, o biossensor foi cuidadosamente lavado com solução tampão $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,50 e colocado em contato com soluções de Metil Paration em concentrações variadas, de 1,0 a

100 ppb, contendo catecol em concentração fixa, de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; as medidas da corrente de redução foram realizadas seqüencialmente, para cada solução, após cerca de 2 min de reação e as medidas de inibição, para cada solução, foram realizadas em triplicata.

Esse procedimento foi repetido para os demais inibidores: diazinon, carbofuran e carbaril, mantidos na faixa de concentração de 1,0 a 100 ppb, sendo que todas as soluções dos OF e CB usadas nesta investigação foram recentemente preparadas.

A resposta de inibição (%Inibição) foi calculada pela diminuição da resposta amperométrica do biossensor, utilizando-se a seguinte expressão:

$$\%Inibição = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100 \quad (5)$$

onde, I_0 e I são as correntes de redução, medidas para as soluções, contendo somente catecol e contendo catecol na presença do inibidor, respectivamente.

CAPÍTULO 3:

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 – Investigações do comportamento eletroquímico do catecol sobre eletrodos de carbono

3.1.1 – Investigações empregando EPC e ECG não modificados

O comportamento eletroquímico do catecol, em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, sobre eletrodo de pasta de carbono, é apresentado na Figura 7.

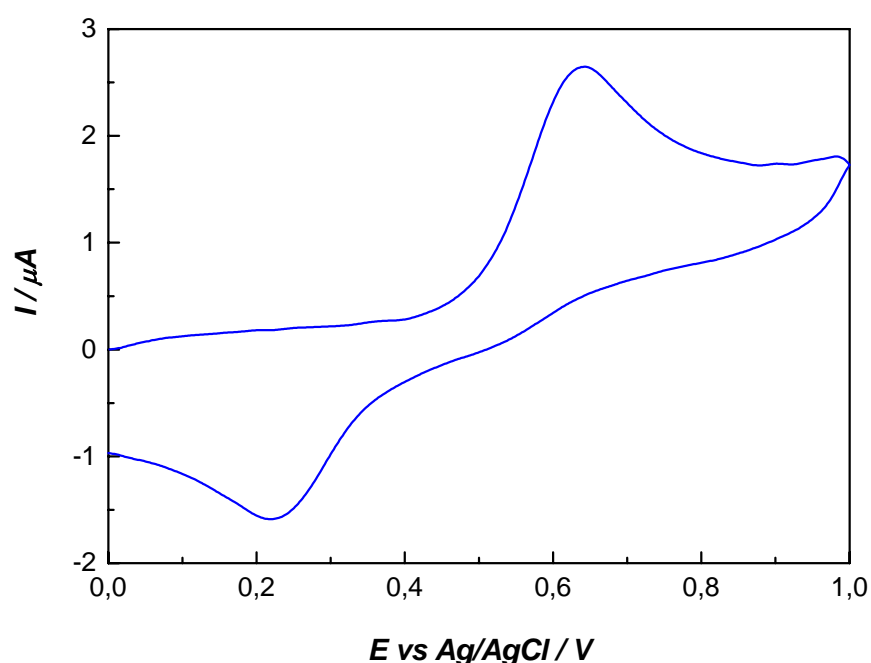
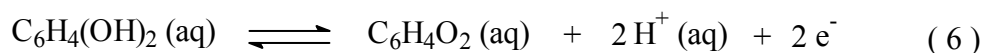


Figura 7: Voltamograma cíclico da solução de catecol $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EPC. Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Eletrodo de trabalho: EPC.

Observa-se pelo VC da Figura 7, que a oxidação eletroquímica do catecol à o-quinona inicia-se num potencial próximo de $+0,5 \text{ V}$, atingindo um potencial de pico anódico (E_{pa}) ao redor de $+0,65 \text{ V vs Ag/AgCl}$. Na varredura inversa, a o-quinona produzida é reduzida a partir de $+0,4 \text{ V}$, atingindo um potencial de pico catódico (E_{pc}) ao redor de $+0,22 \text{ V vs Ag/AgCl}$.

A elevada diferença entre os potenciais de pico catódico (E_{pc}) e anódico (E_{pa}), de aproximadamente 400 mV, explica-se porque o processo redox é eletroquimicamente irreversível [69]. Podendo ser descrito de acordo com:



A equação 6 da reação, mostra que o potencial do processo eletroquímico depende da concentração de H^+ presente na solução. A equação de Nernst para a redução da o-quinona pode ser escrita como:

$$E = E^{o'} - \frac{0,059}{2} \log \frac{[C_6H_4(OH)_2]}{[C_6H_4O_2][H^+]^2} \quad (7)$$

que pode ser rearranjada para,

$$E = E^{o'} - \frac{0,059}{2} \log \frac{[C_6H_4(OH)_2]}{[C_6H_4O_2]} - 0,059 pH \quad (8)$$

sendo $E^{o'}$ é o potencial padrão formal do par $C_6H_4(OH)_2 / C_6H_4O_2$.

A equação 8, mostra que o potencial envolvido, tanto na oxidação do catecol, como na redução da o-quinona, depende da concentração de H^+ , presente na solução.

A Figura 5 mostra as respectivas relações entre E_{pa} e E_{pc} observadas em função do pH da solução de catecol.

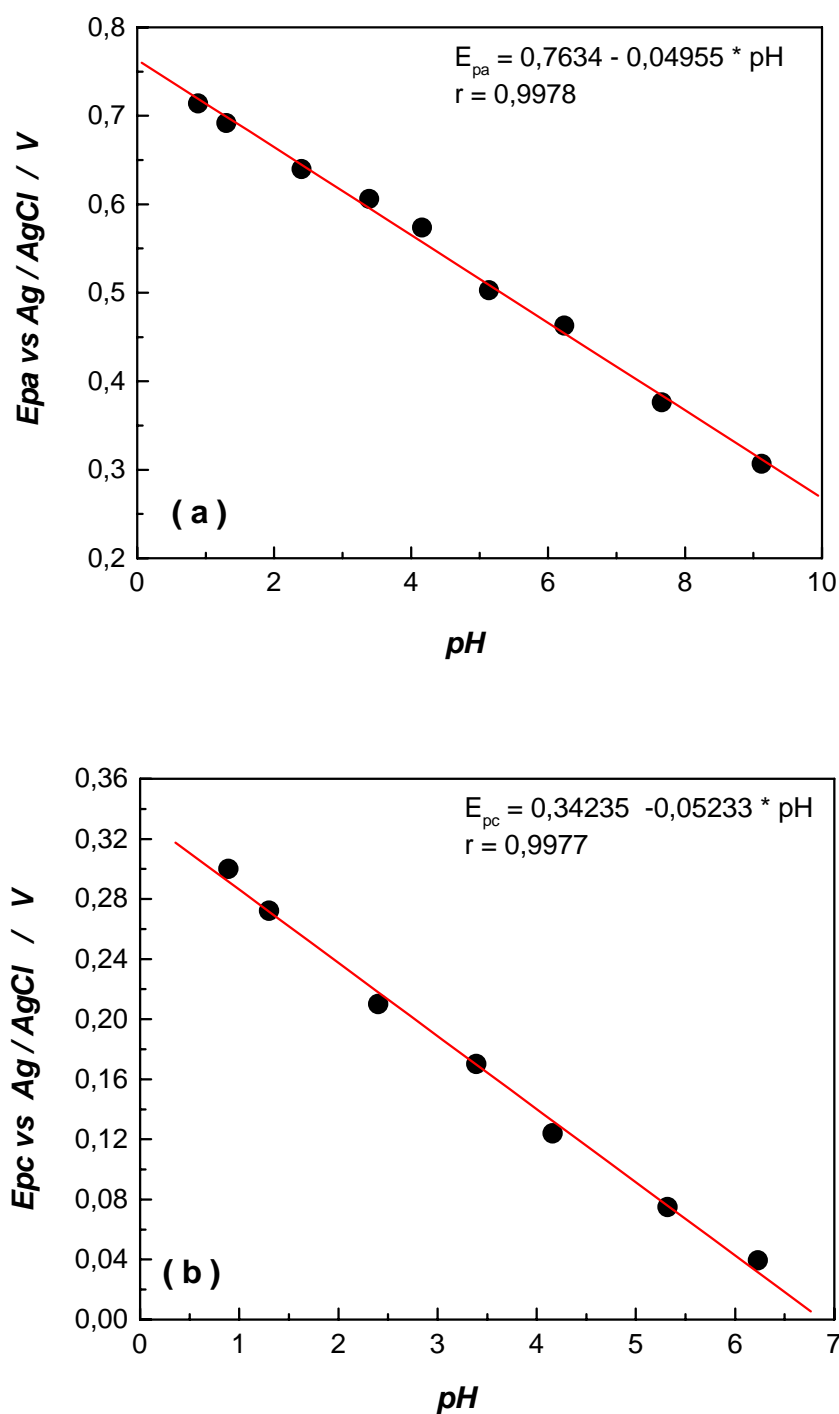


Figura 8: Variação do E_{pa} (a) e do E_{pc} (b) em função do pH da solução de catecol $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, sobre EPC. Eletrólito suporte constituído de tampão citrato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, tendo o pH ajustado com solução de NaOH e H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Investigações foram também realizadas para verificar se a oxidação eletroquímica do catecol e/ou a redução da *o*-quinona são controladas pela difusão das respectivas espécies eletroativas e de H^+ para a superfície do eletrodo. De acordo com a literatura [70], se o processo for controlado por difusão, a corrente de pico devida à redução, será dada segundo a equação 9:

$$I_{pc} = - 2,99 \times 10^5 \ n(\alpha_c n')^{1/2} \ D_{ox}^{1/2} \ A \ C_{ox} \ v^{1/2} \quad (9)$$

onde:

n , é o número de elétrons;

A , a área do eletrodo;

D_{ox} , o coeficiente de difusão da espécie eletroativa na forma oxidada;

C_{ox} , concentração da espécie na forma oxidada;

v , a velocidade de varredura do potencial;

α_c , coeficiente de transferência de carga;

n' , o número de elétrons transferidos na etapa determinante da velocidade.

Uma equação semelhante pode ser definida para a corrente de pico, devido à oxidação do catecol. Conforme a equação 9, se a corrente de redução é controlada por difusão, I_{pc} deverá variar linearmente com a concentração da *o*-quinona na solução e com a raiz quadrada da velocidade de varredura do potencial. Para verificar tal fato, foram obtidos VCs de soluções de catecol, tendo H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte, em função da concentração de catecol e da variação da velocidade de varredura. A partir dos VCs foram obtidos gráficos da corrente de pico catódica (I_{pc}) e da corrente de pico anódica (I_{pa}) em função da velocidade de varredura e da concentração de catecol na solução. Os respectivos gráficos de I_{pa} e I_{pc} estão apresentados na Figura 9.

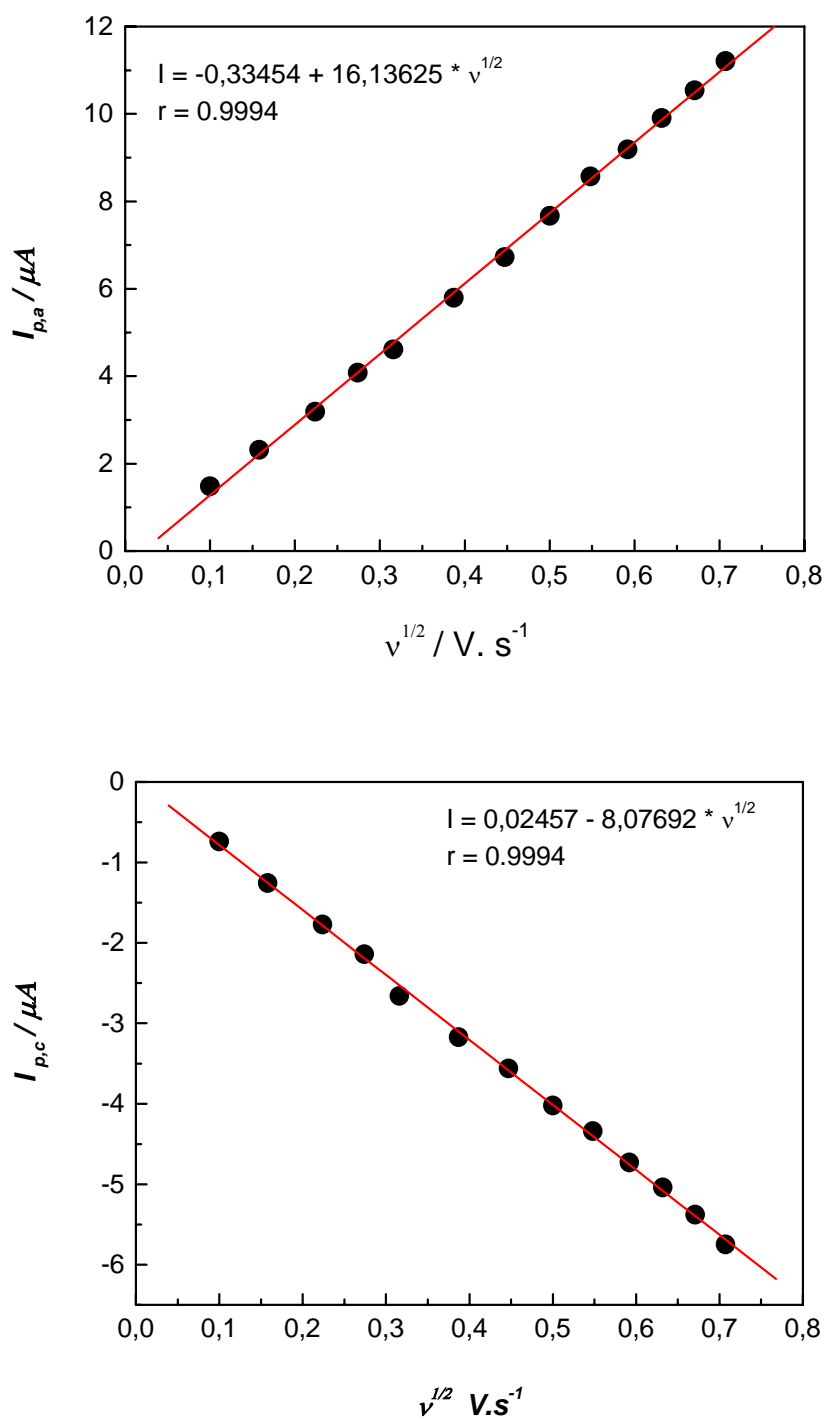


Figura 9: Gráficos de $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$ em função da raiz quadrada da velocidade de varredura do potencial, obtidos de VC de solução de catecol $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ sobre EPC. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

A relação linear observada entre $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$ com a raiz quadrada da velocidade de varredura indica que o processo eletroquímico é controlado pela difusão tanto de catecol como de *o*-quinona para a superfície do eletrodo [69]. O controle difusional da corrente foi também comprovado pela dependência linear da corrente de pico com a concentração de catecol na solução, como mostra a Figura 10.

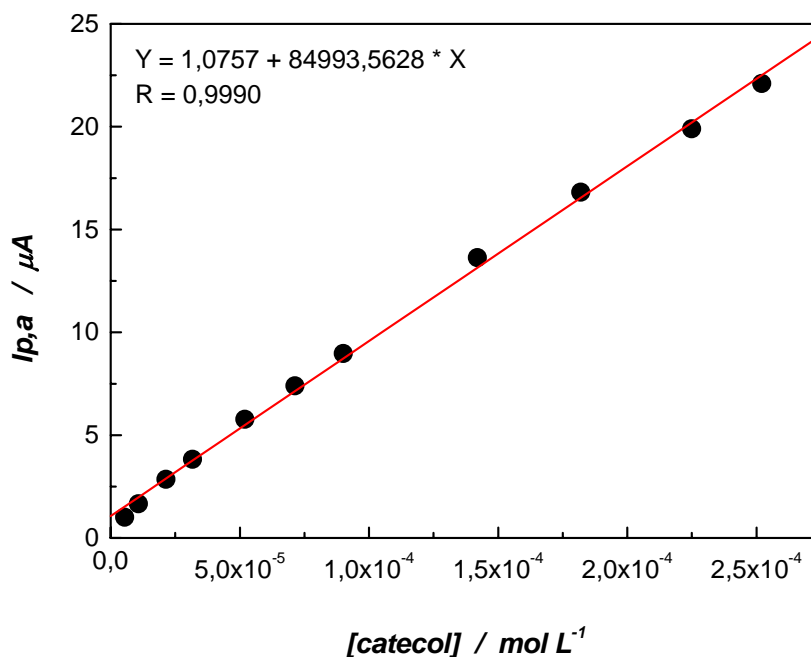


Figura 10: Gráfico de $I_{p,a}$ em função da concentração de catecol, utilizando H_2SO_4 $0,05 mol L^{-1}$ como eletrólito suporte, sobre EPC. Velocidade de varredura $50 mV s^{-1}$.

Estudo semelhante foi realizado para o fenol, obtendo-se resultados comparáveis aos de catecol. Observou-se que o fenol sofre oxidação em potencial próximo de $0,8 V$ vs $Ag/AgCl$, sendo o processo controlado pela difusão de H^+ e de fenol para a superfície do eletrodo.

Os elevados potenciais exigidos para a oxidação dos compostos fenólicos têm como principal desvantagem a interferência de espécies eletroativas, que podem estar presentes em amostras reais. Outro problema relacionado à oxidação eletroquímica de

compostos fenólicos é a tendência à polimerização, que resulta na passivação da superfície do eletrodo, com conseqüente perda da reprodutibilidade da resposta e sensibilidade do eletrodo para os referidos compostos [35, 56]. A Figura 11 ilustra tal fenômeno observado para o EPC, após este ter sido submetido a três ciclos de varredura de potencial, em solução de catecol, tendo o H_2SO_4 $0,05\text{mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte. O pico observado no voltamograma (2), ao redor de 600 mV vs Ag/Ag/Cl, indica a contaminação da superfície do eletrodo por produtos formados durante a oxidação do catecol/redução da quinona, ao longo dos sucessivos ciclos de varredura do potencial.

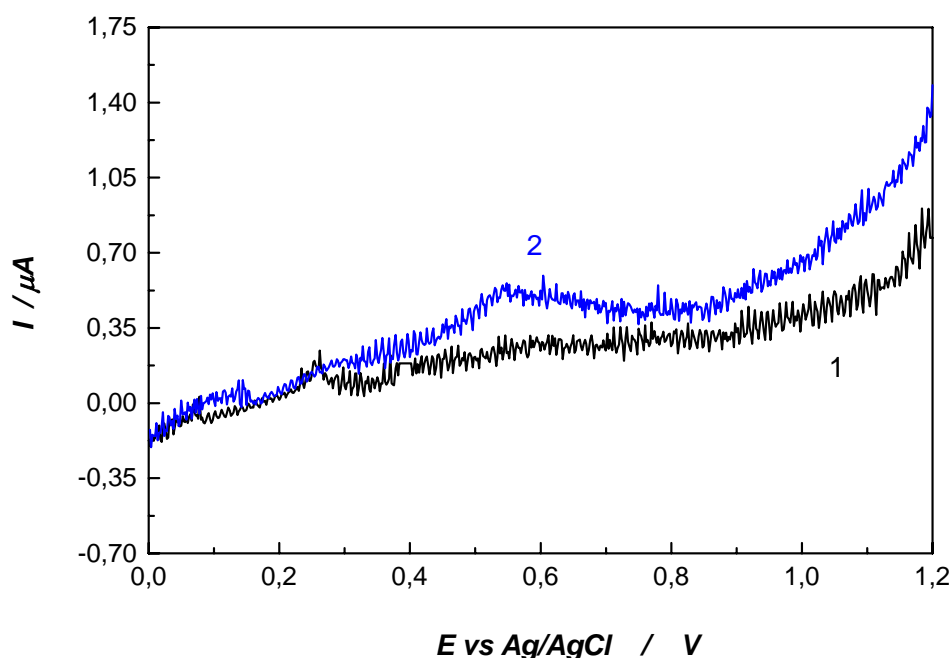


Figura 11: Voltamogramas do EPC em H_2SO_4 $0,05\text{mol L}^{-1}$: (1) antes e (2) após a obtenção de três VCs de solução de catecol $1,2 \times 10^{-5} \text{mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 50mV s^{-1} .

O comportamento eletroquímico do catecol sobre o eletrodo ECG foi semelhante ao observado sobre o EPC, apresentando VC comparável em termos de magnitude da corrente e potenciais de E_{p_a} e E_{p_c} . O ECG apresentou efeitos de passivação, ligeiramente menores que o EPC. A superfície do EPC, sofreu contaminação, após a obtenção de 2 VCs de

catecol, limitando o tempo de vida do eletrodo para 2-3 medidas. Além disso, o EPC apresentou maiores problemas com relação à estocagem.

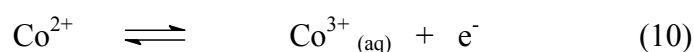
3.1.2 – Investigações empregando EPC-FtCo e ECG-FtCo

Considerando-se os efeitos de memória, observados com os eletrodos de carbono não modificados, devido à formação de produtos eletropolimerizados, que passavam a superfície dos eletrodos, investigou-se no presente trabalho, o uso de mediadores redox, que podem ser incorporados ao interior ou à superfície dos eletrodos de carbono, para minimizar tal problema.

O mediador redox utilizado foi a ftalocianina de Co(II) (*FtCo*). A imobilização desse composto, na forma de um filme, na superfície dos eletrodos de grafite ou EPC, foi submetida a vários procedimentos, sem resultados satisfatórios. A incorporação de *FtCo* durante a preparação do EPC e do ECG, foram os processos que forneceram os melhores resultados. A *FtCo* foi incorporada nos eletrodos em proporções menores que 15%, pois, em maiores proporções, provocou um aumento na resistência elétrica do eletrodo, segundo estudos realizados por Ferreira & Albuquerque [71]. Além disso, o composto em questão, tende a se dimerizar, em soluções aquosas, podendo levar à formação de produtos poliméricos, que passavam a superfície do eletrodo [72].

De acordo com a literatura, os eletrodos de carbono modificados com ftalocianina de Co(II), apresentam um processo de oxidação eletroquímica de Co(II) a Co(III) ao redor de 900 mV vs Ag/AgCl [73]. É imprescindível considerar que vários compostos fenólicos sofrem oxidação eletroquímica na região de potencial do par redox Co(II) /Co(III). Assim, se a *FtCo* exercesse o papel de mediadora redox da oxidação do catecol, as seguintes reações deveriam estar envolvidas:

- Oxidação de Co(II) no eletrodo (+ 0,98 V):



- Na interface eletrodo-solução: o Co^{3+} formado eletroquimicamente, deve oxidar quimicamente o catecol à respectiva quinona:



O Co(II) , se for produzido na reação 11, poderá ser reoxidado novamente a Co(III) no eletrodo, segundo a reação 10, produzindo um aumento na corrente de oxidação, na região de 0,98 V. Dessa forma, a mesma deverá aumentar proporcionalmente com a concentração de catecol na solução.

A indagação inicial do presente trabalho, iniciou-se pela investigação do comportamento eletroquímico dos eletrodos de carbono modificados com *FtCo*, em soluções diluídas de ácido sulfúrico. Observou-se pelos VCs, que o processo eletroquímico do par redox Co(II) /Co(III) só era evidenciado após o 2º ciclo de varredura de potencial, quando o eletrodo era submetido a ciclos sucessivos de varredura de potencial. Ao cessarem as varreduras de potencial, o respectivo processo eletroquímico desaparecia e o mesmo era observado, somente após novos ciclos de varredura posteriores, conforme ilustra a Figura 12.

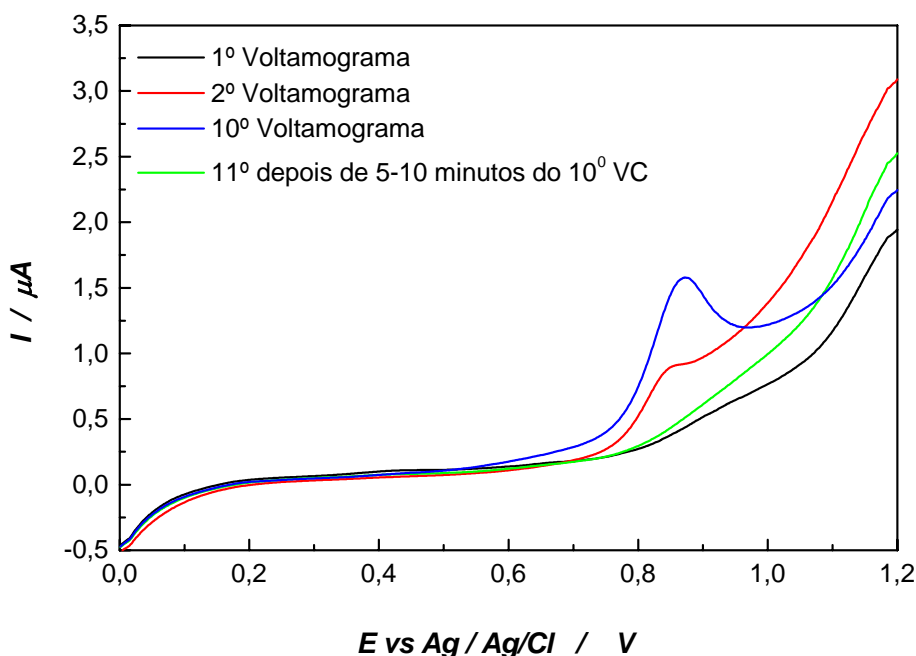


Figura 12: Voltamogramas de eletrodo do EPC-FtCo (5% FtCo), em solução de H_2SO_4 0,05 mol L^{-1} , em função do número de ciclos de varredura de potencial. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

Investigações do comportamento eletroquímico do catecol sobre os ECG-FtCo e EPC-FtCo, mostraram que somente o processo redox do catecol/*o*-quinona era evidenciado nos VCs. Tal fato, pode ser observado no VC apresentado na Figura 13. Observa-se pelo VC da Figura 13, que o processo eletroquímico do catecol/*o*-quinona, ocorre na mesma região de potencial observada para os eletrodos EPC e ECG (Figura 7). Observou-se ainda que I_{pc} e I_{pa} obtidas nos VCs das Figura 13 e Figura 7, apresentam magnitudes comparáveis.

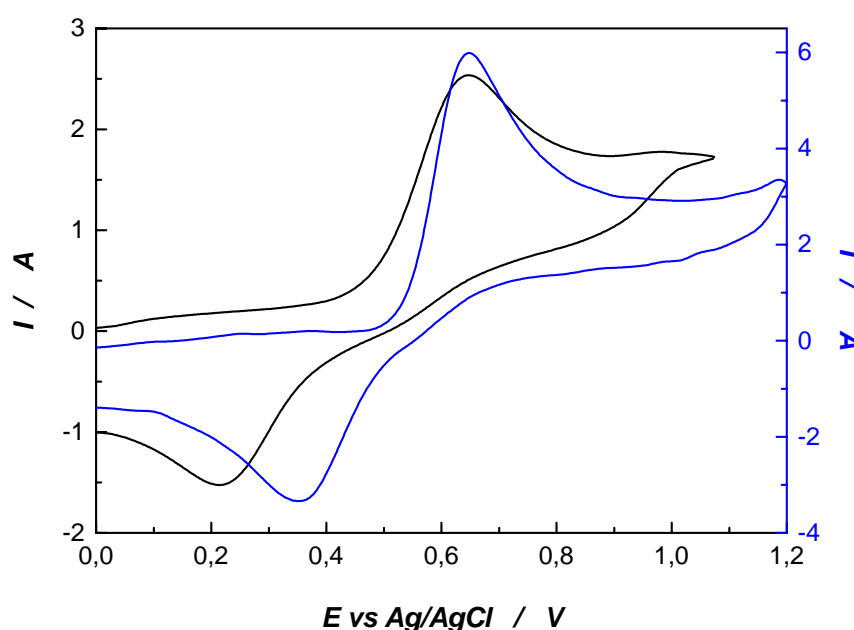


Figura 13: Voltamograma cíclico da solução de catecol (—) $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre ECG-FtCo e (—) $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EPC. Eletrólito suporte H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

Além deste fato, pode-se observar também que o ECG-FtCo oferece menor resistência à passagem de corrente elétrica, observado pela menor inclinação do pico de oxidação, como também um pequeno deslocamento no potencial de redução da *o*-quinona tornando o processo eletroquímico menos irreversível. Do que se deduz, que o par redox Co(II)/Co(III) , presente nos ECG-FtCo e EPC-FtCo, poderia não estar atuando como

mediadora do processo de oxidação eletroquímica do catecol como esperado, mas deve contribuir de alguma forma para este processo. No sentido de confirmar tal fato, foram realizadas investigações mais detalhadas, com soluções de catecol mais diluídas. Os VCs dessas soluções, obtidas sobre os ECG-FtCo e EPC-FtCo, mostraram o aparecimento de dois processos, identificados como o do par catecol/*o*-quinona e o do par Co(II)/Co(III) (Figura 14).

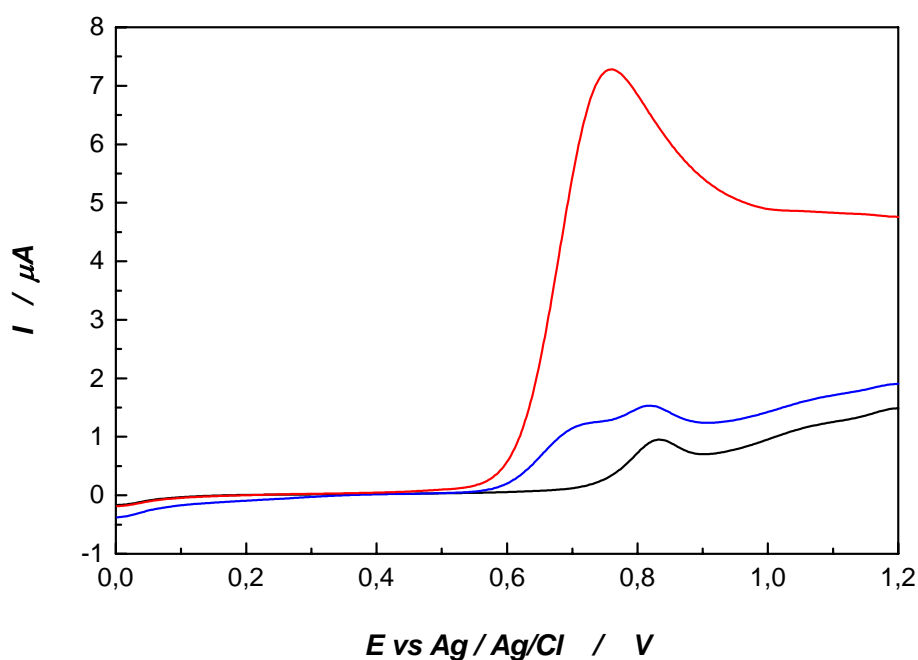


Figura 14: Voltamogramas da solução (—) eletrolito suporte H₂SO₄ 0,05 mol L⁻¹ e da solução de (—) catecol 1,6 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ e de (—) catecol 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ sobre EPC-FtCo. Velocidade de varredura 50 mV s⁻¹.

A observação de que os processos catecol/*o*-quinona e Co(II)/Co(III) ocorrem de formas aparentemente independente (Figura 14), pois nenhum efeito foi observado nas magnitudes das correntes de oxidação e/ou de redução dos referidos processos, sugere que a *FtCo* presente nos eletrodos, não deve estar atuando como mediadora redox da oxidação eletroquímica, do catecol. Apesar desse fato, os estudos de estabilidade da resposta e

tempo de uso do eletrodo mostraram que o ECG-FtCo apresenta vantagens muito superiores aos eletrodos de carbono não modificados, como também sobre o EPC-FtCo. O EPC-FtCo, embora tenha apresentado menores “efeitos de memória” que os eletrodos de carbono, não modificados (EPC e ECG), apresentou menor tempo de vida útil e maiores correntes residuais, comparado ao ECG-FtCo. Constatou-se pelos VCs que o ECG-FtCo não sofria praticamente nenhum efeito de passivação, mesmo após a obtenção de vários VCs de soluções de catecol, na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Na Figura 15 encontra-se o VC do ECG-FtCo em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ após ter sido utilizado para obter aproximadamente 15 VCs de solução de catecol $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

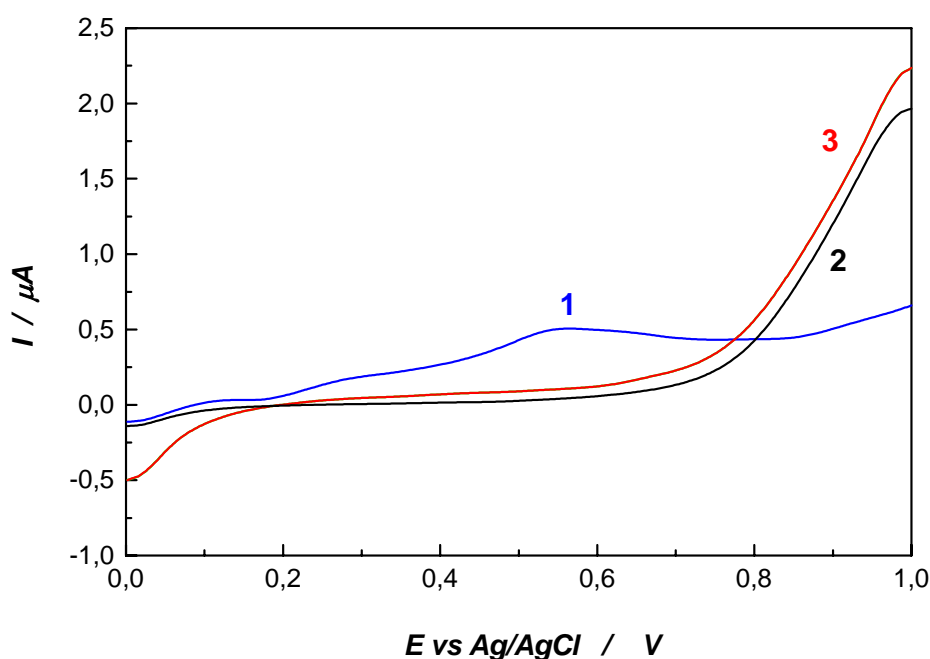


Figura 15: Voltamogramas de EPC e ECG-FtCo (5%) em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$:
(1) EPC após obter 2 VCs de solução de catecol $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (2) ECG-FtCo eletrólito suporte (3) ECG-FtCo após obter 15 VCs de solução de catecol $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Observa-se pela Figura 15 que o VC do ECG-FtCo (5% de FtCo), em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, apresenta uma corrente residual muito baixa, após ter sido empregado para

obter 15 VCs da solução de catecol $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O EPC, ao contrário, mostra a presença de produtos fenólicos, adsorvidos na superfície do eletrodo, após obter 2 VCs da mesma solução de catecol.

A Tabela 1, apresenta a comparação das características mais relevantes observadas no estudo do comportamento eletroquímico do catecol sobre os quatro eletrodos investigados.

Tabela 1: Comparação dos eletrodos de carbono em termos do Limite de Detecção (LD) para catecol, n^0 de medidas realizadas e principais vantagens e desvantagens.

Eletrodo	LD para Catecol, mol L^{-1}	n^0 de medidas	Vantagens / Desvantagens
<i>EPC</i>	$2,5 \times 10^{-7}$	2	baixo custo, fácil preparação, fácil contaminação e não permite estocagem.
<i>EPC-FtCo</i>	$1,5 \times 10^{-6}$	≈ 10	fácil preparação, não permite estocagem.
<i>ECG</i>	$8,4 \times 10^{-6}$	$\approx 2 - 5$	baixo custo, fácil preparação, permite estocagem e fácil contaminação.
<i>ECG-FtCo</i>	$1,0 \times 10^{-6}$	≈ 65	fácil preparação, permite estocagem e maior tempo de vida eletrodo.

Verifica-se pelos dados da Tabela 1, que o ECG-FtCo apresentou menor sensibilidade para a determinação do composto fenólico investigado do que o EPC. Limites de detecção para o catecol 10 vezes superiores, foram encontrados pelo EPC em relação aos EPC-FtCo e ECG-FtCo. A maior estabilidade da linha base, obtida pelos ECG-FtCo, representa uma das principais vantagens do seu uso como detectores para o catecol.

A menor sensibilidade dos ECG-FtCo é superada pelo aumento da reprodutibilidade da resposta do mesmo. Apesar do LD não ser muito favorável, o eletrodo apresenta uma sensibilidade suficientemente alta para a determinação ou o monitoramento do catecol, numa solução amostra de interesse. Devido a esse fato e, considerando os resultados apresentados na Tabela 1, o eletrodo com características mais adequadas para ser utilizado como transdutor amperométrico, neste estudo de biossensores à base de tirosinase, é o ECG-FtCo.

Conforme descrito anteriormente, os estudos realizados não evidenciaram o papel da ftalocianina de cobalto (II) como mediadora da oxidação eletroquímica do catecol. O mecanismo pelo qual a ftalocianina de Co(II) promove uma maior reprodutibilidade da resposta do eletrodo, não é conhecido. Acredita-se, que essa substância minimize a formação de produtos poliméricos, durante a oxidação do catecol e/ou redução da *o*-quinona, ou, impeça que os produtos eletropolimerizados, sejam adsorvidos na superfície do eletrodo, provavelmente por impedimento estérico [68]. A estrutura da molécula de ftalocianina de Co(II) está ilustrada na Figura 16.

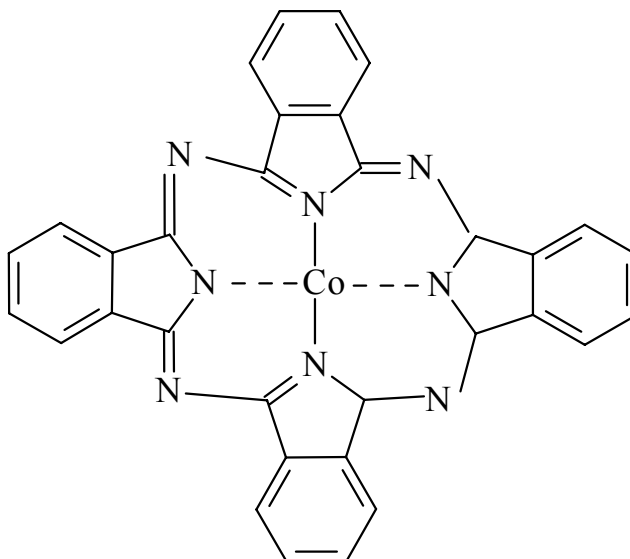


Figura 16: Molécula de Ftalocianina de Co(II)

3.2 – Investigações realizadas com o biossensor amperométrico

3.2.1 – Características gerais do biossensor

O esquema do funcionamento do biossensor amperométrico, proposto neste trabalho, está apresentado na Figura 17.

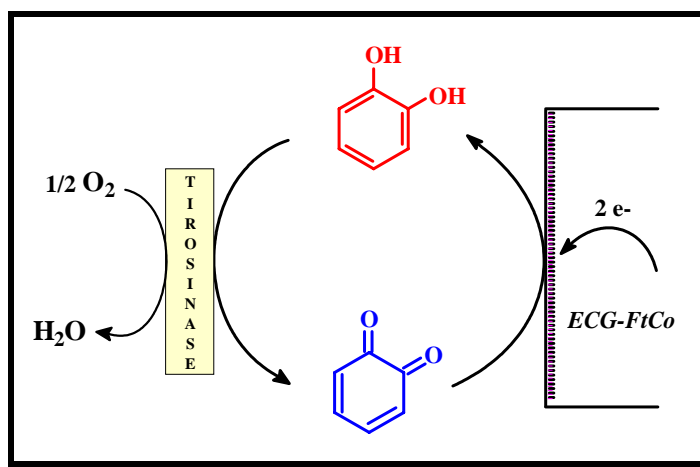


Figura 17: Esquema do funcionamento do biossensor amperométrico à base de tirosinase.

De acordo com o esquema da Figura 17, a *o*-quinona, produzida na reação enzimática, é imediatamente reduzida a catecol no eletrodo, estabelecendo-se um ciclo entre catecol e *o*-quinona, que leva a uma corrente cataliticamente amplificada. Segundo Marko-Varga et al. [74], a amplificação do sinal, por meio do ciclo catecol-quinona, pode levar a um aumento da sensibilidade do biossensor, em até 70 vezes. A redução eletroquímica imediata, da *o*-quinona, proporciona uma vantagem adicional aos biossensores amperométricos, em termos de estabilidade operacional, pois as quinonas, por serem muito instáveis, em soluções aquosas, podem ser prontamente polimerizadas para compostos poliaromáticos [75]. Outra reação paralela, que pode ocorrer é a adição de

nucleófilos a *o*-quinona. Em soluções aquosas, a água é o nucleófilo mais importante, levando à formação do composto 1,2,4 trihidroxibenzeno [76].

Como a resposta do biossensor amperométrico depende da combinação complexa dos fatores que governam tanto a cinética enzimática como também daqueles que governam o sinal amperométrico que será gerado no transdutor, requereu-se uma diversidade de estudos realizados, com a finalidade de se obter resultados que contribuíssem para uma maior compreensão e maior reprodutibilidade a resposta gerada.

Assim sendo, o acompanhamento da reação enzimática, em função do tempo foi um estudo muito importante, pois permitiu conhecer a duração pela qual a *o*-quinona alcança a concentração máxima, produzindo, por consequência, a máxima resposta do biossensor.

3.2.2 – Investigação da oxidação do catecol envolvendo tirosinase imobilizada na superfície dos eletrodos ECG-FtCo

De acordo com o discutido anteriormente, a *o*-quinona, após formada na reação enzimática, pode participar de reações paralelas, antes de ser reduzida no transdutor amperométrico. Nessa situação, o biossensor pode produzir um sinal eletroquímico menor que o esperado ou de baixa reprodutibilidade. Considerando-se esse fato, investigou-se a relação entre o tempo da reação enzimática envolvida no biossensor amperométrico e o sinal eletroquímico gerado, com a finalidade de se encontrar as condições que garantem a maior reprodutibilidade da referida resposta. Essa investigação foi realizada, monitorando-se as mudanças na quantidade de *o*-quinona produzida e de catecol consumido na reação enzimática envolvida no biossensor amperométrico. A *o*-quinona foi detectada pela redução em $-0,2\text{ V}$ e o catecol por oxidação em $+0,6\text{ V}$. A detecção de ambos os compostos foi realizada conforme procedimento descrito no item 2.7.2.

A Figura 19, apresenta os valores de I_{p_c} e I_{p_a} obtidos em função do tempo da reação enzimática, para uma concentração de catecol de $2,0 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$. Observou-se pelas magnitudes de I_{p_c} e I_{p_a} , que o detector eletroquímico, apresenta maior sensibilidade

para acompanhar as mudanças na quantidade de catecol consumida (Figura 19-A), do que para acompanhar as mudanças na quantidade de quinona produzida (Figura 19-B).

As curvas da Figura 19-A, mostram um resultado, que parece confirmar a ocorrência das reações paralelas com a *o*-quinona, mencionadas anteriormente. É possível observar que num tempo de aproximadamente 2,5 min, tem-se a quantidade mínima de catecol e máxima de *o*-quinona na solução em estudo. Após este tempo, a *o*-quinona está sujeita a reações secundárias, ocasionado uma diminuição na corrente de redução, a qual confirma a formação de produtos resultantes da adição nucleofílica da água à *o*-quinona, formando produtos que podem ser oxidados eletroquimicamente, conforme ilustra a Figura 18, a qual mostra o caminho proposto para a hidroxilação do fenol catalisada pela enzima tirosinase.

Resultados similares foram também obtidos com a enzima tirosinase livre (60U) nas mesmas condições experimentais, como mostram os voltamogramas de varredura linear, obtidos da solução em função do tempo da reação enzimática (Figura 20).

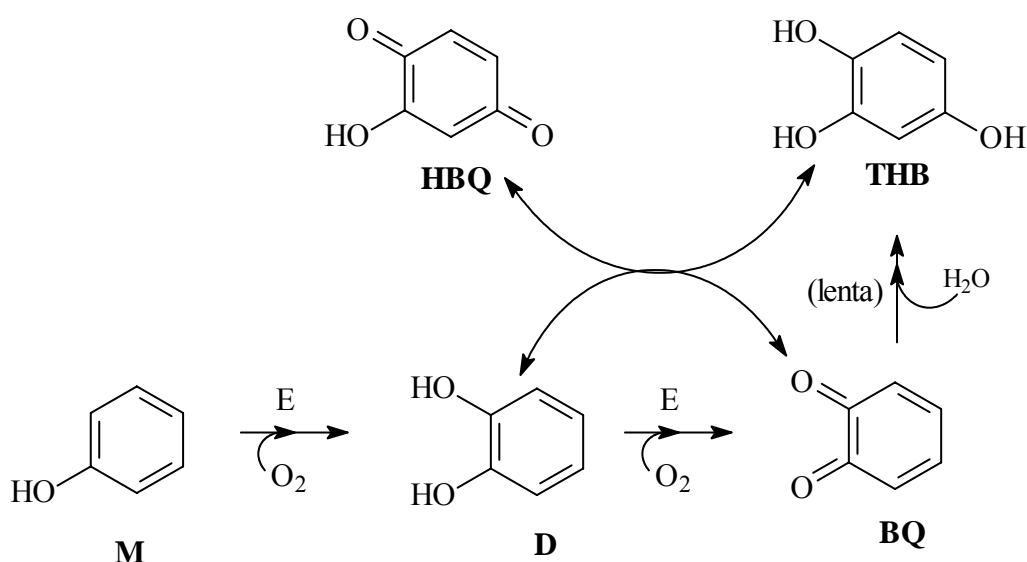


Figura 18: Caminho de reação proposto para hidroxilação do fenol catalisada pela enzima tirosinase. E, enzima; M, fenol; D, catecol; BQ, *o*-benzoquinona; THB, 1,2,4-trihidroxibenzeno; HBQ, hidroxibenzoquinona [76].

Observa-se, praticamente o mesmo comportamento eletroquímico de catecol/quinona, tanto para a enzima imobilizada e livre, como para soluções de substrato mais diluídas ou mais concentradas. Deste modo, o tempo de reação enzimática, neste sistema investigado não deve ultrapassar 2,5 min, a fim de se obter resposta efetivamente confiável do biossensor.

Os resultados apresentados nas Figura 19 e Figura 20, mostram que o eletrodo ECG-FtCo apresenta resposta concordante para ambos os compostos. A resposta do biossensor pode ser obtida tanto pela detecção do catecol consumido, como pela detecção da *o*-quinona produzida. Entretanto, como a detecção do catecol, envolve potenciais superiores aos usados na detecção da *o*-quinona, esta é frequentemente usada para avaliar a resposta dos biossensores quando utilizados em amostras reais.

3.2.3 – Influência da temperatura no processo de catálise enzimática

A temperatura é outro importante fator, a ser considerado na atividade de catálise enzimática, sendo que, as proteínas possuem geralmente, elevadas energias de ativação de desnaturação, o que significa uma acentuada dependência da taxa de desnaturação com a temperatura.

Neste trabalho, não foi verificada a influência da temperatura na resposta do biossensor, uma vez que se visou construir um modelo com aplicação de monitoramento ambiental “*on site*”, de pesticidas organofosforados e carbamatos totais, baseados na inibição da resposta do catecol, pela enzima tirosinase.

Deste modo, todas as análises efetuadas foram realizadas à temperatura ambiente, que não ultrapassou a faixa de 25 - 27 °C.

A temperatura “ótima” de trabalho das enzimas óxido-redutases, como é o caso da tirosinase, geralmente é em torno de 20-30 °C. Estudos reportados na literatura, também descrevem este valor para a tirosinase [78,79].

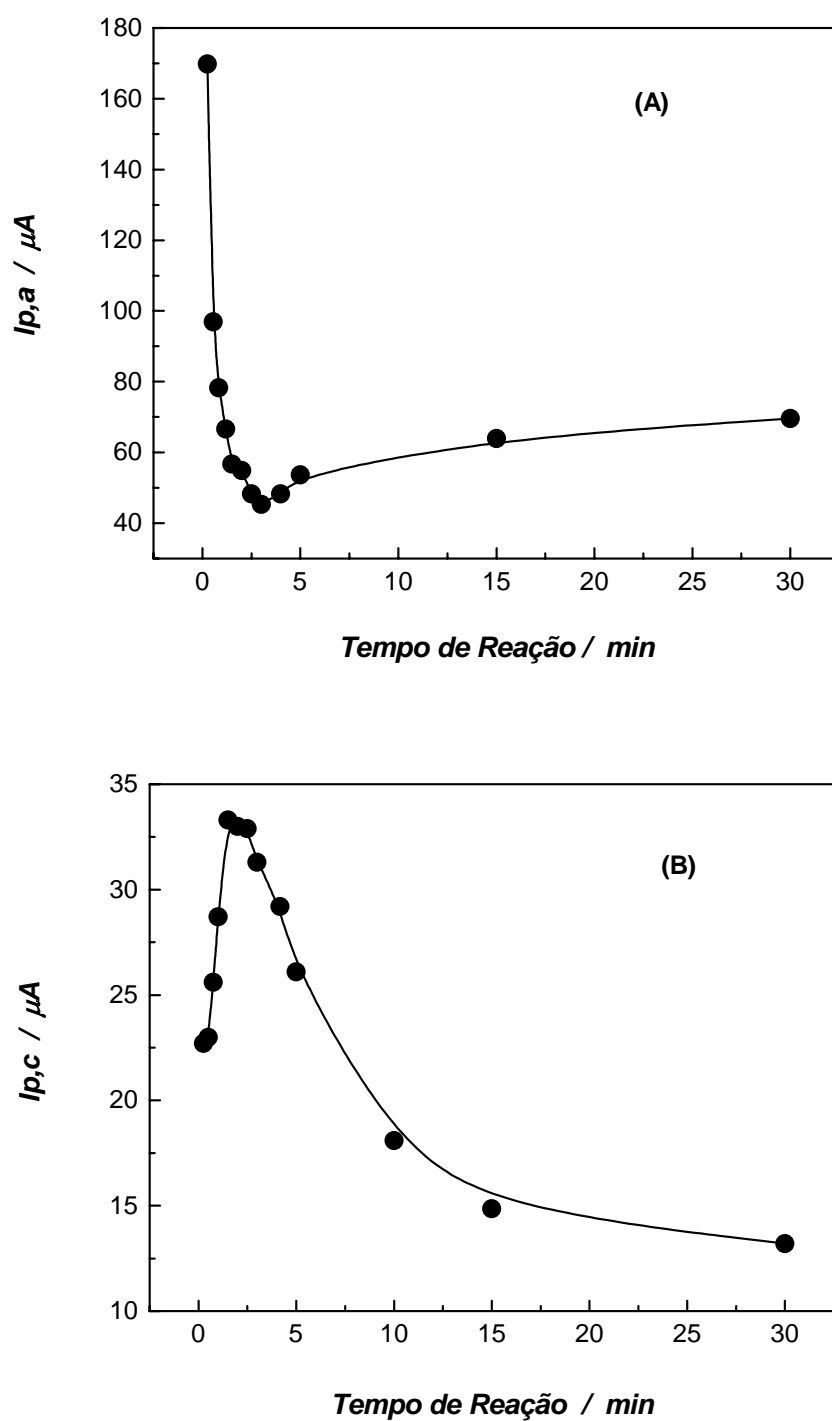


Figura 19: Variação de I_{pc} e I_{pa} em função do tempo da reação enzimática, obtidos para solução de catecol $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,50, na presença de enzima tirosinase imobilizada (60 U) sobre eletrodo ECG-FtCo. (A) consumo de catecol; (B) geração da *o*-quinona.

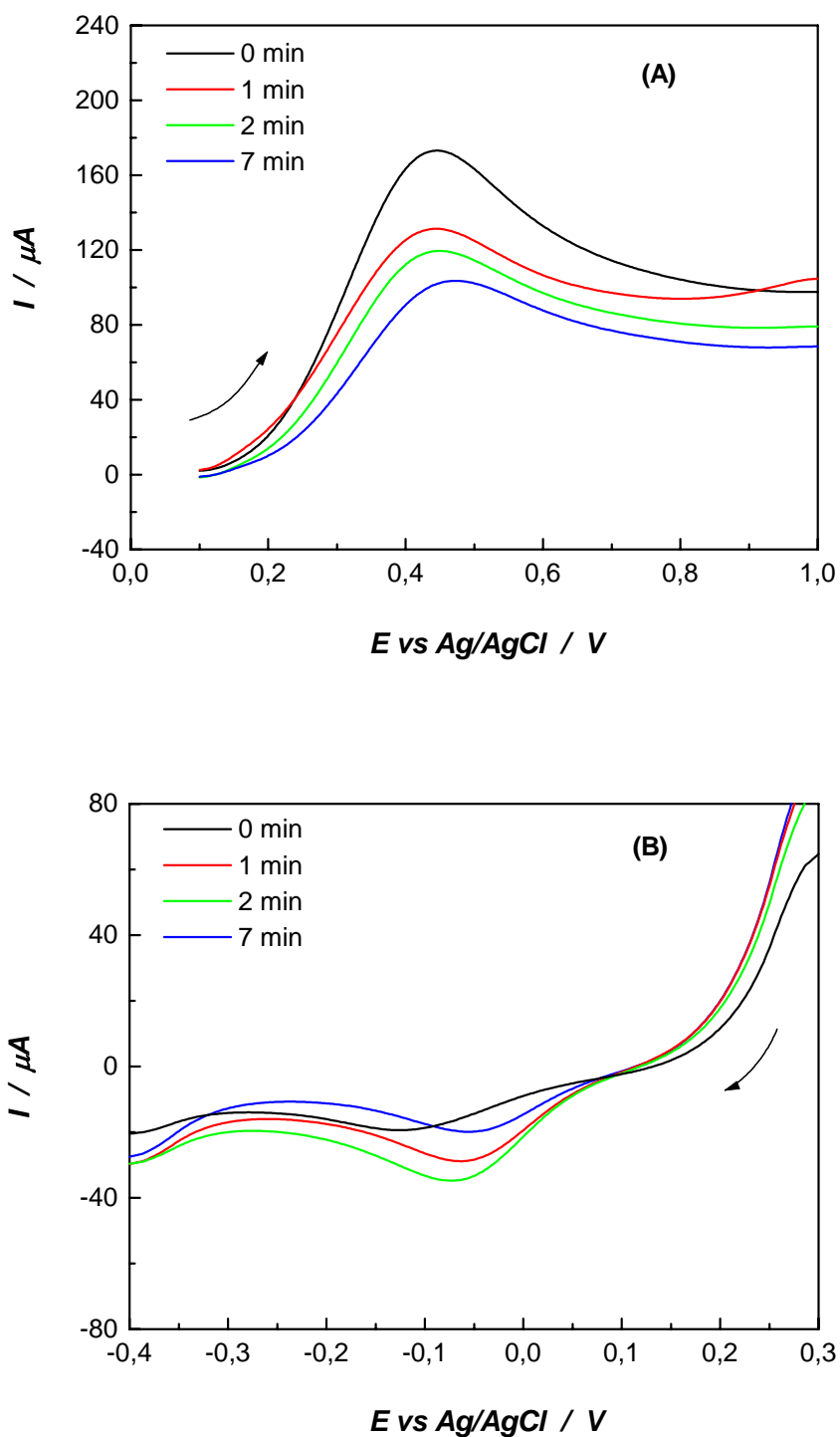


Figura 20: VCs em função do tempo da reação enzimática. (A) consumo de catecol e (B) produção de quinona, obtidos para solução de catecol $2,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,50 na presença de enzima tirosinase livre (60 U), empregando-se o ECG-FtCo. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

3.2.4 – Resposta do biossensor em função do pH da solução tampão

As enzimas têm um valor de pH ótimo no qual sua atividade é máxima: em soluções de pH maiores ou menores, a atividade da enzima diminui, resultado este, do efeito sobre uma combinação de fatores como [77]: a ligação do substrato com a enzima; o sítio catalítico da enzima; a ionização do substrato e a mudança conformacional da estrutura da enzima.

O efeito do pH sobre a atividade está associado às modificações provocadas sobre determinados resíduos de aminoácidos do centro ativo, os quais desempenham papel crítico na atividade enzimática. Esses resíduos devem ser mantidos num determinado estado de ionização, para desempenharem um papel essencial nas interações, que mantêm a estrutura da enzima. Assim, dependendo do pH da solução, pode-se eliminar uma interação iônica, essencial para manter a conformação ativa da enzima e, afetar conseqüentemente, a interação enzima-substrato [77].

As investigações conduzidas para determinar o pH fornecedor da melhor resposta do biossensor, foram realizadas utilizando-se soluções tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na faixa de pH 5,00 a 8,00.

A resposta do biossensor em função do pH, está disposta na Figura 21. Observa-se que a melhor resposta é obtida em pH 6,50 dentro da faixa estudada. Em valores de pH menores que 6,50, a atividade da enzima imobilizada no biossensor é mais sensível às mudanças dos íons H^+ , do que em valores maiores que 6,50.

A influência do pH sobre a catálise enzimática, pode ser melhor compreendida, lembrando-se, que as enzimas, apresentam grupos ionizáveis, principalmente aqueles presentes nas cadeias laterais da histidina. Alguns destes grupos podem fazer parte do sítio ativo da enzima ou serem importantes para a manutenção da sua estrutura tridimensional.

Assim, dependendo do pH da solução, alguns grupos da enzima, podem ser protonados ou desprotonados. Nesse sentido, existe uma concentração hidrogeniônica, que propicia, um arranjo de grupos protonados e desprotonados, que leva a enzima a uma conformação ideal para exercer sua atividade catalítica. Este pH ótimo depende, portanto,

do número e tipo de grupos ionizáveis que uma enzima apresenta e da sequência em que estão organizados, ou seja, depende de sua estrutura primária.

Pelos resultados experimentais obtidos, o pH ideal da enzima tirosinase é 6,50, sendo este valor concordante aos reportados na literatura [68,78,79,80] demonstrando a boa sensibilidade e eficiência do biossensor investigado.

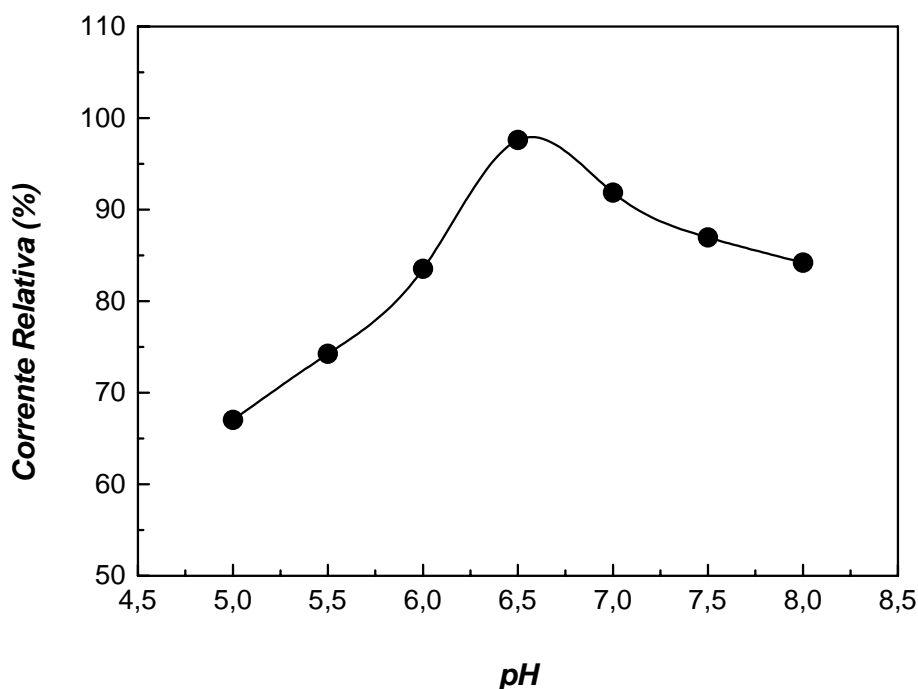


Figura 21: Resposta do biossensor amperométrico, obtida em - 0,2 V vs Ag/AgCl (KCl 0,1 mol L⁻¹), em função do pH da solução tampão fosfato. Eletrólito: solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹. Concentração de catecol: 2,3 x 10⁻⁴ mol L⁻¹.

3.2.5 – Resposta do biossensor em função da concentração do tampão fosfato

A concentração de tampão, que forneceu a melhor resposta do biossensor, foi a de 0,05 mol L⁻¹ (Figura 22). Observa-se pela Figura 22 que em concentrações maiores e menores que 0,05 mol L⁻¹, ocorre a diminuição da atividade catalítica da enzima. Por outro lado, em concentrações maiores que 0,05 mol L⁻¹, ocorre uma diminuição da atividade

catalítica, que pode estar relacionado à competição entre os grupos fosfato e o substrato, pelo centro metálico da enzima, caracterizando uma inibição competitiva [9,81].

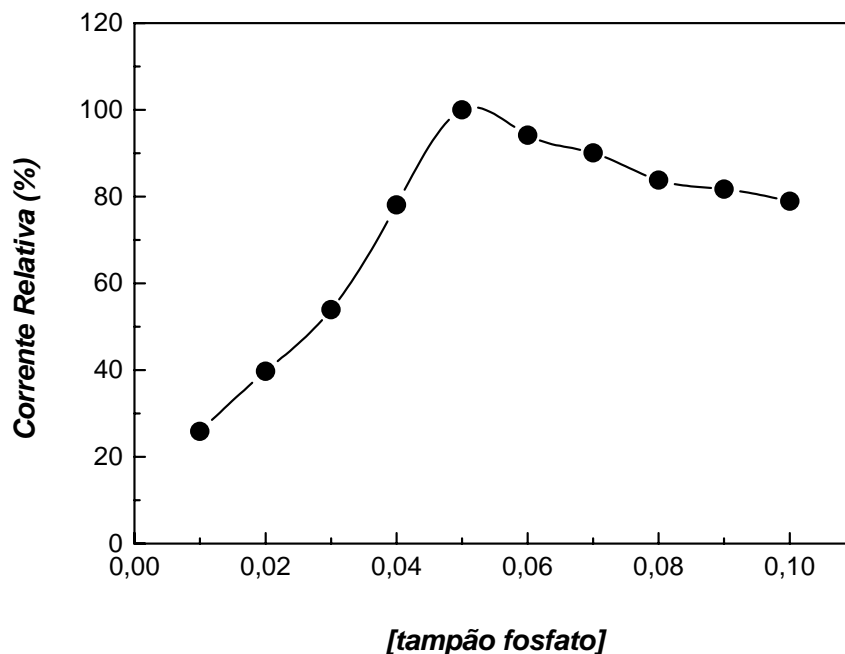


Figura 22: Resposta do biossensor amperométrico, obtida em - 0,2 V vs Ag/AgCl (KCl 0,1 mol L⁻¹), em função da concentração da solução tampão fosfato, em pH 6,50, contendo KCl 0,1 mol L⁻¹. [catecol] = 2,3 x 10⁻⁴ mol L⁻¹.

3.2.6 – Resposta do biossensor em função da concentração de catecol

Esse estudo foi realizado empregando-se soluções de catecol na faixa de 1,0 x 10⁻⁶ a 6,0 x 10⁻³ mol L⁻¹, tendo como eletrólito solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 6,50. A resposta do biossensor, em função da concentração do catecol, está apresentada na Figura 23. Observa-se pela curva uma relação linear com o aumento da concentração de catecol, de 5,0 x 10⁻⁵ a 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹, até atingir um valor estacionário, a qual, indica a presença de moléculas de catecol que ainda não foram oxidadas e, podem ser catalisadas pela reação enzimática, onde a velocidade da reação enzimática é diretamente proporcional à concentração de catecol.

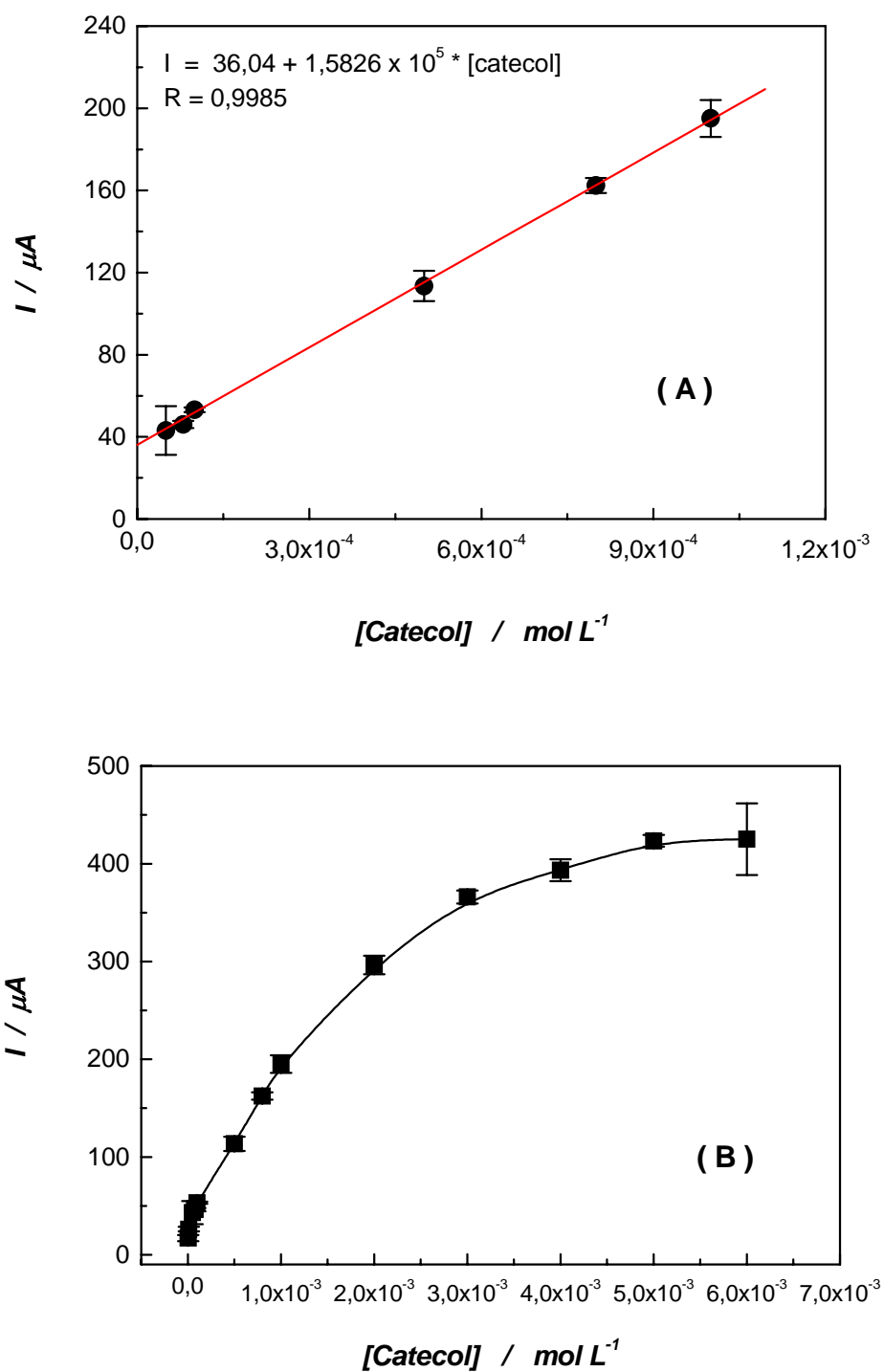


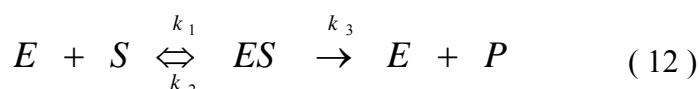
Figura 23: Resposta do biossensor amperométrico, em - 0,2 V vs Ag/AgCl (KCl 0,1 mol L⁻¹), em função da concentração da solução de catecol, em tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 6,50. (A) somente região linear; (B) região completa até a saturação.

Na região, em que a resposta do biossensor praticamente se mantém constante ocorre à saturação da enzima pelo substrato, a qual é governada pela quantidade de enzima imobilizada na superfície do eletrodo.

O limite de detecção obtido para catecol, a partir da resposta do biossensor em solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,50, foi da ordem de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

3.2.7 – Determinação de K_M e I_{Max} da enzima imobilizada

Uma reação catalisada enzimaticamente, processa-se em duas etapas: na primeira, a enzima (E) liga-se reversivelmente ao substrato (S), formando um complexo enzima-substrato (ES); na segunda fase é liberado o produto (P) e a enzima volta a sua forma livre, podendo, então, ligar-se a outra molécula do substrato, conforme mostra a equação 12.



onde:

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (13)$$

O valor da constante de Michaelis-Menten, indica a afinidade que a enzima apresenta pelo substrato. Quanto maior essa afinidade, menor será o valor de K_M .

A constante aparente de Michaelis-Menten, K_M^{app} , pode ser determinada experimentalmente, utilizando-se a relação de *Eadie-Hofstee*, da equação de Michaelis-Menten [67]. A expressão de *Eadie-Hofstee*, para os biossensores amperométricos é dada por:

$$I = I_{\text{max}} - K_M^{\text{app}} (I / C) \quad (14)$$

onde: I = corrente atingida numa dada concentração do substrato; I_{max} = corrente máxima após saturação pelo substrato e C = concentração do substrato.

Ressalte-se, que os valores de K_M^{app} e de $I_{\text{máx}}$ não são características somente da enzima, mas também do biossensor. Em geral, quando o filme de enzima imobilizada é suficientemente fino, a resposta do biossensor (corrente) é, limitada pelo processo enzimático que ocorre na superfície do eletrodo e, não pelo transporte de massa do substrato, para a referida superfície.

A constante aparente, K_M^{app} , foi determinada, para o biossensor de tirosinase desenvolvido, utilizando-se o procedimento proposto por Cosnier & Innocent [68]. O gráfico de *Eadie-Hofstee* (Figura 24), foi obtido a partir dos dados de corrente e da concentração de catecol apresentados na Figura 23-B.

A partir da Figura 24 obteve-se o valor de K_M^{app} de 1,6 para a enzima imobilizada, mM, o qual foi menor que o obtido para a enzima livre (K_M^{app} de 2,3 mM), sugerindo uma maior afinidade da enzima imobilizada pelo substrato, que pode explicado, considerando-se que o catecol gerado da redução eletroquímica, da *o*-quinona produzida enzimaticamente, pode entrar num outro ciclo de oxidação enzimática, fornecendo um aumento local na concentração do substrato e uma amplificação da resposta do eletrodo [56].

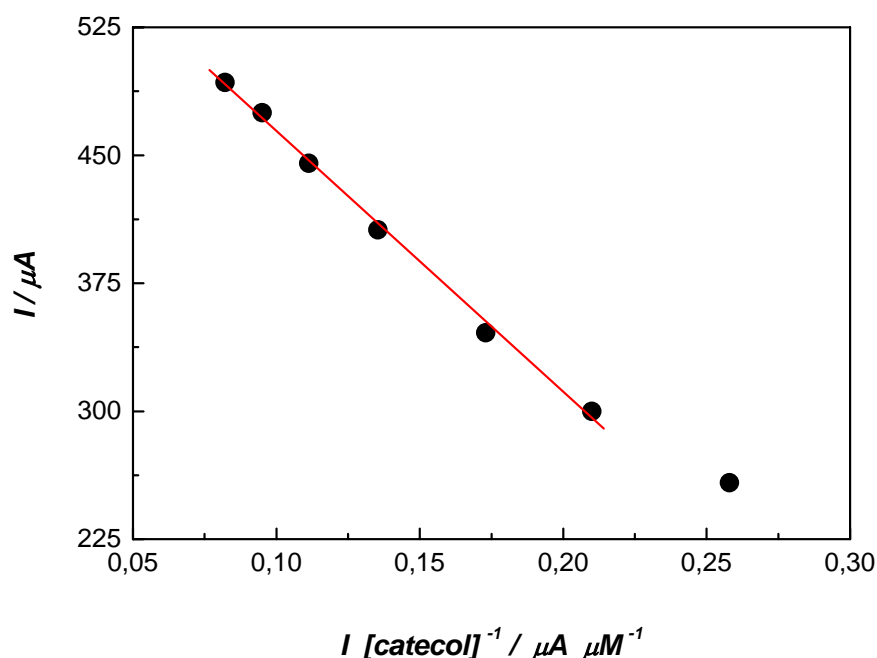
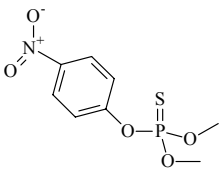
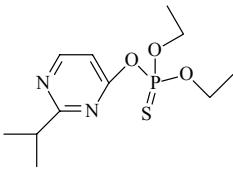
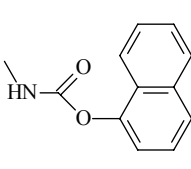
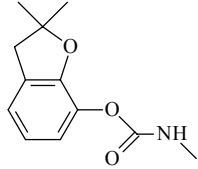


Figura 24: Gráfico de *Eadie-Hofstee* para obtenção da K_M da enzima tirosinase imobilizada.

3.2.8 – Avaliação da inibição da enzima tirosinase pelos inseticidas OF (Metil Paration, Diazinon) e CB (Carbaril e Carbofuran)

Algumas características físico-químicas, estruturais e toxicológicas dos inseticidas investigados encontram-se descritos na Tabela 2. Esses compostos, podem ser empregados como medicamentos, inseticidas fitossanitários, nematicidas, larvicidas e acaricidas sistêmicos ou como zoossanitários, no campo e no lar, sendo responsáveis por intoxicações humanas e em animais domésticos. O uso desses inseticidas numa grande variedade de culturas, encontra-se apresentado na Tabela 3.

Tabela 2: Principais características físico-químicas, estruturais e toxicológicas dos inseticidas selecionados para estudo.

	<i>ORGANOFOSFORAFOS</i>		<i>CARBAMATOS</i>	
	METIL PARATION	DIAZINON	CARBARIL	CARBOFURAN
Fórmula Química	$C_8H_{10}NO_5PS$	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	$C_{12}H_{11}NO_2$	$C_{12}H_{15}NO_3$
Nome Comercial	Folidol	Diazinon	Sevin	Furadan
Estrutura				
Peso Molecular (g.mol ⁻¹)	263,30	304,34	201,22	221,25
Solubilidade em água (ppm)	60	60	120	351
*DL ₅₀ (mg.Kg ⁻¹)	14	300	300	8
**Toxicidade	Classe I	Classe II	Classe II	Classe I

*DL₅₀ = dose letal; representa a dose capaz de matar 50% da população testada (ratos).

** Classe I - produtos extremamente tóxicos (faixa vermelha); Classe II - produtos altamente tóxicos (faixa amarela).

Tabela 3: Principais aplicações dos inseticidas selecionados para estudo.

<i>INSETICIDA</i>	<i>PRINCIPAIS APLICAÇÕES</i>
Metil Paration	Algodão, batata, café, citros, feijão, fumo, milho, soja, tomate, trigo, videira, rosa, gladiolo, goiaba, maçã, pêra, manga, pêssego, figo, cravo, caqui, caju, alho, cebola, amendoim, arroz, berinjela, pimentão, brócolis, couve, couve-flor, repolho, abacate, abacaxi, alface, almeirão e chicória.
Diazinon	Citrus, maçã
Carbaril	Batata, fumo, abacaxi, algodão, amendoim, arroz, banana, beterraba, cenoura, soja, pêssego, trigo, cana, cebola, alho, laranja, limão, tangerina, melão, melancia, moranga, abóbora, ameixa, maçã, pepino, chuchu, feijão, ervilha, tomate, berinjela, jiló, pimentão, pimenta, alfafa, quiabo, alface, chicória, couve, couve-flor, repolho, brócolis, mandioca, milho, flores, arbustos, gramados, rabanete, citros, campineiras, folhagens.
Carbofuran	Algodão, amendoim, arroz, banana, batata, café, cana, cenoura, feijão, fumo, milho, repolho, tomate, tratamento de sementes: milho, arroz, feijão, algodão, trigo.

Fonte: Manual técnico de produtos das empresas.

A taxa de inibição da enzima tirosinase, imobilizada no biossensor, foi obtida a partir dos valores de corrente, medidos em - 0,2 V, na ausência e presença de cada um dos inibidores, segundo procedimento experimental descrito no item 2.10. Na ausência do inibidor, o biossensor apresenta a resposta máxima para a *o*-quinona produzida. A taxa de inibição da enzima, pelo inibidor, foi acompanhada pela resposta do biossensor para a *o*-quinona produzida, à -0,2 V vs Ag/AgCl, na presença de concentrações crescentes do mesmo, de 1,0 a 100 ppb. As medidas de corrente, foram realizadas após 2 min de contato do biossensor com a solução, contendo uma concentração fixa de catecol ($5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) e concentrações variadas do inibidor.

O gráfico da inibição da resposta do biossensor (% Inibição), em função da concentração de Metil Paration é apresentado na Figura 25. Observou-se, que esse inseticida causa inibição da atividade da enzima, a partir de 1,2 ppb. Uma relação linear entre a % de Inibição e a concentração de Metil Paration, foi observada na faixa de concentração de 6,0 a 100 ppb.

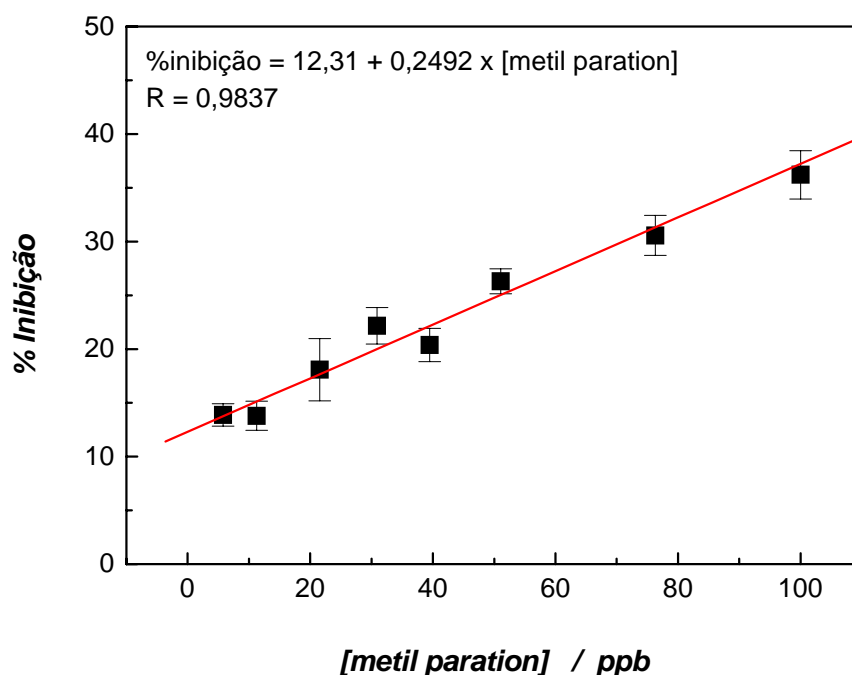


Figura 25: Resposta de Inibição em função da concentração de Metil Paration. Média de três determinações.

A resposta inicial do biossensor, foi rapidamente restaurada, mantendo-se o mesmo em contato com uma solução de catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, durante 2 min. Investigações da % de inibição da enzima imobilizada pelo Diazinon, Carbaril e Carbofuran foram também realizadas. Cujos dados obtidos nesses estudos, estão apresentados na Figura 26. A Tabela 4 resume os resultados de inibição obtidos.

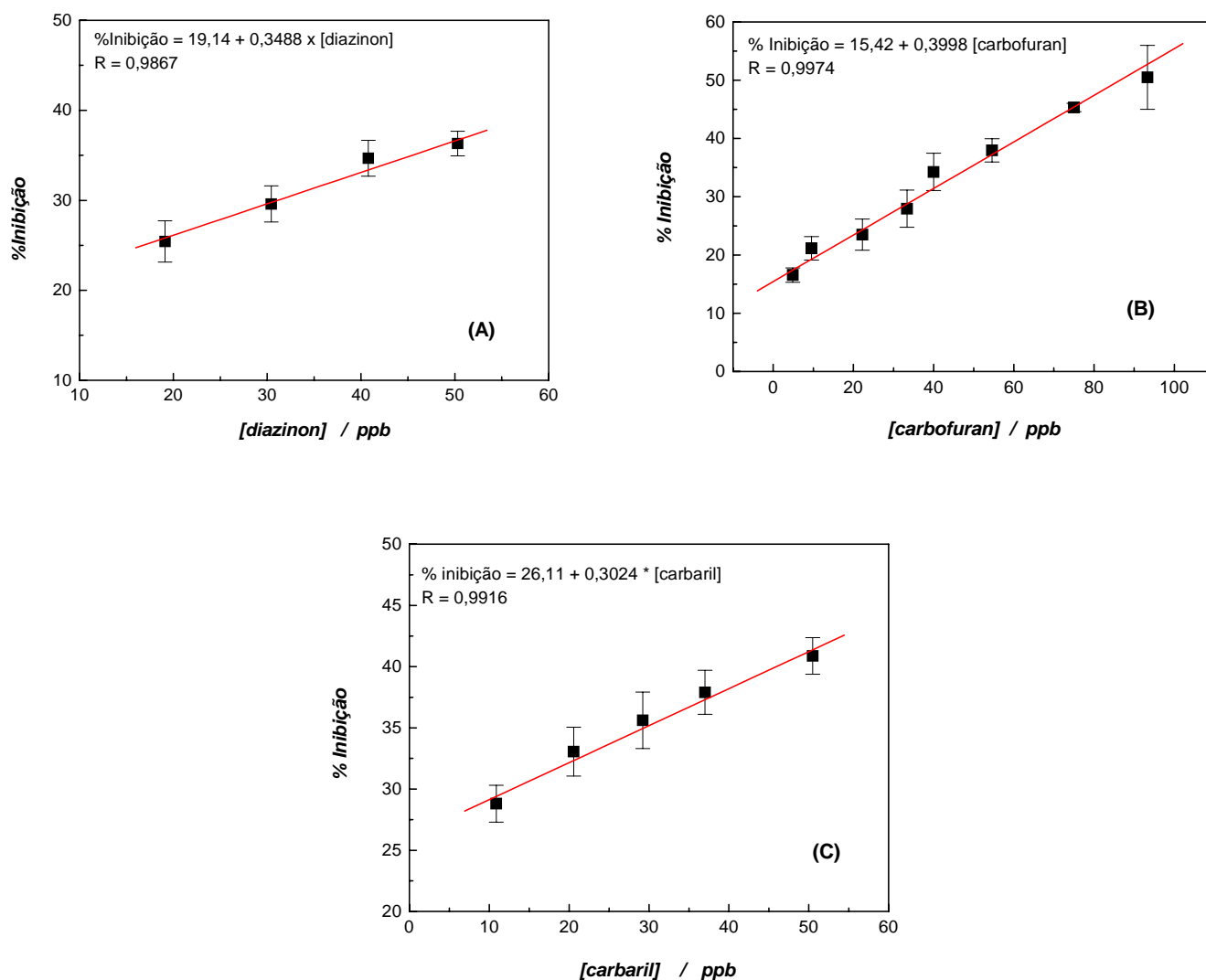


Figura 26: Inibição em função da concentração dos inseticidas: (A) diazinon, (B) carbofuran e (C) carbaril. Média de três determinações.

Investigou-se também, a eficiência do biossensor de tirosinase, para a determinação dos respectivos inseticidas em amostras de água. Os estudos iniciais foram realizados para o Metil Paration. Para tanto, as amostras de água foram *fortificadas* com Metil Paration em concentração de 30 ppb e este foi determinado pelo biossensor, nas condições experimentais que ofereceram a maior resposta. Observou-se uma recuperação média de 98,53 % com desvio padrão relativo de $\pm 1,01$, para três determinações. Investigações

semelhantes foram conduzidas, para amostras de água *fortificadas* com Diazinon, Carbofuran e Carbaril em níveis de 30 ppb, respectivamente. Recuperações médias de $96,36 \% \pm 2,09$, $92,64\% \pm 1,40$ e $93,94 \% \pm 1,80$, foram obtidas para os respectivos compostos.

Tabela 4: Faixa linear da % de Inibição e Limite de Determinação obtidos pelo biossensor amperométrico.

<i>Inseticida</i>	<i>Faixa Linear da % Inibição, ppb</i>	<i>Limite de quantificação, ppb</i>
Metil Paration	6,00 – 100,00	1,17
Diazinon	19,00 – 50,00	19,11
Carbofuran	5,00 – 93,00	1,49
Carbaril	11,00 – 50,00	1,38

Outra investigação foi realizada para uma amostra de água fortificada com os quatro inseticidas estudados, em níveis de 30 ppb, para cada inseticida respectivamente. Observou-se que a resposta de inibição do biossensor amperométrico foi à somatória da % de inibição individual exercida por cada inseticida. Tal fato indica que o biossensor possibilita a determinação da quantidade total de pesticidas, carbamatos e organofosforados, presentes na amostra. Neste caso, como está previsto na legislação brasileira [10], a concentração total de pesticidas, organofosforados e carbamatos totais, deve ser expressa em termos do Paration. Essa concentração pode ser facilmente obtida utilizando-se uma curva de calibração semelhante à da Figura 25.

Investigações da eficiência do biossensor para a determinação de pesticidas totais em termos de Metil Paration mostraram uma recuperação de $99,21 \%$ com desvio padrão da ordem de $\pm 0,71$. Os resultados obtidos, nesse conjunto de análises, comprovaram que o biossensor proposto apresenta resposta altamente confiável, possibilitando excelente

recuperação do sinal para os inseticidas carbamatos e organofosforados totais em amostras reais. Tais resultados foram confirmados utilizando-se outro biossensor, preparado segundo o mesmo procedimento. Níveis de recuperação, em torno de 99 %, foram encontrados, com um desvio padrão relativo, da ordem de 3%.

CAPÍTULO 4:

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

4.1 – Conclusões

Os resultados mostraram, que o eletrodo compósito de grafite modificado com ftalocianina de Co(II), ECG-FtCo, apresenta maior estabilidade da resposta e maior reprodutibilidade na determinação dos compostos fenólicos investigados. Entretanto, esse eletrodo mostrou menor resposta eletroquímica para a oxidação dos referidos compostos orgânicos quando comparado à resposta eletroquímica obtida com EPC. A atuação da ftalocianina de Co(II), como mediadora redox da oxidação eletroquímica, dos compostos fenólicos investigados, não foi observada.

Os ECG-FtCo, foram utilizados como transdutores eletroquímicos, dos biossensores à base de tirosinase, por serem de fácil preparação, possuírem um maior tempo de vida útil, maior estabilidade da resposta e por serem descartáveis, quando contaminados.

Investigações da resposta do biossensor, para a *o*-quinona produzida, na reação enzimática, mostraram que o biossensor, apresenta uma resposta linear para catecol, na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, com limite de detecção da ordem $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, em solução tampão 0,05 mol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹, em pH 6,50.

A determinação de K_M possibilitou caracterizar a afinidade da enzima imobilizada no biossensor pelo substrato. Um valor de K_M , de 1,6 mM foi obtido para a enzima imobilizada, contra 2,3 mM para a enzima livre. A pequena diferença, medida constatou que a imobilização praticamente não afetou a afinidade da enzima pelo catecol.

Investigações da inibição da enzima imobilizada por organofosforados (Metil Paration e Diazinon) e carbamatos (Carbaril e Carbofuran), mostraram que a mesma pode ser inibida por esses compostos. Uma relação linear entre a % de inibição e a concentração do inibidor na solução, foi obtida para todos os compostos investigados, na faixa de 6 a 100 ppb para metil paration, 19 a 50 ppb para o diazinon, 5 a 93 ppb para o carbofuran e de 11 a 50 ppb para o carbaril.

Os resultados de recuperação, obtidos pelo biossensor, para as amostras de água *fortificadas* com Metil Paration, Diazinon, Carbaril e Carbofuran, mostraram que o mesmo

pode ser usado, na determinação desses compostos, em amostras ambientais e de alimentos.

4.2 – Propostas de continuidade

Os resultados verificados nas investigações realizadas, mostraram que o biossensor pode ser aplicado no monitoramento de compostos OF e CB totais. A validação desses biossensores para a quantificação de OF e CB totais em água e em extratos de amostras de alimentos e matrizes ambientais deverá ser realizada utilizando-se a técnica CLAE com detecção UV.

Considerando-se, que os biossensores de tirosinase não permitem a discriminação dos inseticidas OF e CB, presentes nos extratos das amostras reais, pretende-se investigar o uso desses biossensores, como detectores de CLAE, para determinar traços de OF e CB eluídos da coluna cromatográfica. Poderá também ser investigado, o uso dos eletrodos de carbono modificados como detectores eletroquímicos de CLAE, para a determinação dos compostos OF e CB, que podem ser eletroquimicamente oxidados ou reduzidos, sobre os eletrodos, buscando-se simplificar os procedimentos de *clean-up*, exigidos pela técnica cromatográfica.

CAPÍTULO 5:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- 1 - *Relatório da ONU sobre o Desenvolvimento Mundial da Água: Água para os Povos, Água para Vida*. Um resumo executivo (36 páginas) está disponível em sete línguas: http://www.unesco.org/water/wwap/wwdr/ex_su_mmary, **2003**, acesso em 10/02/2005.
 - 2 - BAIRD, C.; *Química Ambiental*, 2^a ed. Porto Alegre, Bookman, **2002**, 622.
 - 3 - Rueda, M.; Sarabia, L. A.; Herrero, A.; Ortiz, M. C.; *Soft calibration in a flow system with electrochemical detection: Application to the determination of phenolic compounds*, *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 446, 267-277 .
 - 4 - Davi, M. L.; and Gnudi, F.; *Phenolic compounds in surface water*, *Water Research*, **1999**, 33, 3213-3219.
 - 5 - Lacorte, S.; and Barceló, D.; *Rapid Degradation of Fenitrothion in Estuarine Waters*, *Environmental Science & Technology*, **1994**, 28, 1159-1163.
 - 6 - Nistor, C.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Ciucu, A.; *Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds*, *Analytical Chimica Acta*, **1999**, 387, 309-326.
 - 7 - Svitel, J.; and Miertus, S.; *Development of Tyrosinase-Based Biosensor and Its Application for Monitoring of Bioremediation of Phenol and Phenolic Compounds*, *Environmental Science Technology*, **1998**, 32, 828-832.
 - 8 - Ortega, F.; Domínguez, E.; Burestedt, E.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; *Phenol oxidase-based biosensors as selective detection units in column liquid chromatography for the determination of phenolic compounds*, *Journal of Chromatography A*, **1994**, 675, 65-78.
 - 9 - Russell, I. M.; and Burton, S. G.; *Development and demonstration of an immobilised-polyphenol oxidase bioprobe for the detection of phenolic pollutants in water*, *Analytical Chimica Acta*, **1999**, 389, 161-170.
 - 10 - *Resolução Conama N° 20, de 18 de junho de 1986*. Classifica as águas doces, salobras e salinas essencial à defesa de seus níveis de qualidade, avaliados por

- parâmetros e indicadores específicos, de modo a assegurar seus usos preponderantes. Publicado no DOU de 30/07/86, disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html>, acesso em 20/12/2004.
- 11 - Vincent, G.; In *Organic Micropollutants in the Aquatic Environmental*; Angeletti, G.; Bjorseth, A. (Eds); Kluwer Dordrecht, **1991**, 285.
- 12 - EPA Method 604, *Phenol Environmental Protection Agency*, Part III, 40 CFT Part 136, *Fed Regist*, **1984**, 58.
- 13 - *Ambient Water Quality Criteria for Phenol*, U.S. EPA 440/5-80-066; U.S. EPA, Washington, DC, **1980**.
- 14- Puig, D.; Ruzgas, T.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; Barceló, D.; *Characterization of Tyrosinase-Teflon/Graphite Composite Electrodes for the Determination of Catechol in Environmental Analysis, Electroanalysis*, **1996**, 8, 885-890.
- 15 - Campanella, L.; Beone, T.; Sammartino, M. P.; Tomassetti, M.; *Analysis of dopa in pharmaceutical preparations and of total phenols content in urine by means of an enzyme-amperometric sensor, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1993**, 11, 1099-1104.
- 16 - *Vigilância Epidemiológica de Doenças e Agravos Específicos*, in Guia de Vigilância Epidemiológica. Cap 5. Disponível em <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/GVE/GVE0515G.htm>, acesso em 10/09/2004.
- 17 -Vanloon, G. W.; and Duffy, J.; *A global Perspective, Environmental Chemistry*. Oxford: University Press, **2001**.
- 18 - Driss, M. R.; Hennion, M. C.; Bouguerraca M. L.; *Determination of carbaryl and some organophosphorus pesticides in drinking water using on-line liquid chromatographic preconcentration techniques, Journal of Chromatography A*, **1993**, 639, 352-358.

-
- 19 - Kandell, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessel, T. M.; ***Fundamentos da Neurociência e do Comportamento***, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, **2000**.
- 20 - Torres, C. M.; Picó, Y.; Mañes, J.; ***Comparison of octadecylsilica and graphitized carbon black as materials for solid-phase extraction of fungicide and insecticide residues from fruit and vegetables***, *Journal of Chromatography A*, **1997**, 778, 127-137.
- 21 - Lacassie, E.; Dreyfuss, M. F.; Daguet, J. L.; Vignaud, M.; Marquet, P.; Lachâtre, G. ***Multiresidue determination of pesticides in apples and pears by gas chromatography–mass spectrometry***, *Journal of Chromatography A*, **1998**, 805, 319–326.
- 22 - Nunes, G. S.; Alonso, R. M.; Ribeiro, M. L.; Barceló, D.; ***Determination of aldicarb, aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone in some fruits and vegetables using high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry***, *Journal of Chromatography A*, **2000**, 888, 113–120.
- 23 - Caballo-Lopez, A.; and Luque de Castro, M. D. ; ***Continuous ultrasound-assisted extraction coupled to on line filtration–solid-phase extraction–column liquid chromatography–post column derivatisation–fluorescence detection for the determination of N-methylcarbamates in soil and food***, *Journal of Chromatography A*, **2003**, 998, 51-59.
- 24 - Abad, A.; Moreno, M. J.; Pelegrí, R.; Martínez, M. I.; Sáez, A.; Gamón, M.; Montoya, A.; ***Determination of carbaryl, carbofuran and methiocarb in cucumbers and strawberries by monoclonal enzyme immunoassays and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: An analytical comparison***, *Journal of Chromatography A*, **1999**, 833, 3-12.
- 25 - Parellada, J.; Narváez, A.; López, M. A.; Domínguez, E.; Fernandes, J. J.; Pavlov, V.; Katakis, I.; ***Amperometric immunosensors and enzyme electrodes for environmental applications***, *Analytical Chimica Acta*, **1998**, 362, 47-57.

-
- 26 - Puig, D.; and Barceló, D.; ***Determination of phenolic compounds in water and waste water, TrAC Trends in Analytical Chemistry***, **1996**, 15, 362-375.
- 27- Martinez, R. C.; Gonzalo, E. R.; García, F. G.; Méndez, H.; ***Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of organophosphorus pesticides in waters with dual electrochemical (reductive-oxidative) detection***, *Journal of Chromatography A*, **1993**, 644, 49-58.
- 28 - Niessner, G.; Buchberger, W.; Bonn, G. K; ***Rapid multiresidue screening method for the determination of pesticides in plant materials***, *Journal of Chromatography A*, **1996**, 737, 215-222.
- 29 - Jáuregui, O.; and Galceran, M. T.; ***Determination of phenols in water by on-line solid-phase disk extraction and liquid chromatography with electrochemical detection***, *Analytica Chimica Acta* ,**1997**, 340, 191-199.
- 30- Trojanek, A. “***Volumetric Detectors for HPLC and other Analytical Flow Through Systems***”. Proceeding of a Symposium Sponsored by the Analytical and Faraday Division of the Royal Society of Chemistry, held September 15-16-1981, in Chelsea College, London, England, Plenum Press, New York, **1984**.
- 31 - Achilli, G.; Cellerino, G. P.; Melzi d’Eril, G.; Bird, S.; ***Simultaneous determination of 27 phenols and herbicides in water by high-performance liquid chromatography with multielectrode electrochemical detection***, *Journal of Chromatography A*, **1995**, 697, 357-362.
- 32 - Rueda, M. E.; Sarabia, L. A.; Herrero, A.; Ortiz, M. C.; ***Soft calibration in a flow system with electrochemical detection: Application to the determination of phenolic compounds***, *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 446, 269-279.
- 33 - Weisshaar, D. E.; Tallman, D. E.; Anderson, J. L.; ***Kel-F-graphite composite electrode as an electrochemical detector for liquid chromatography and application to phenolic compounds***, *Analytical Chemistry*, **1981**, 53, 1809-1813.

-
- 34 - Bejerano, T.; Forgacs, C.; Gileadi, E.; ***Selective inhibition of electrode reactions by organic compounds I. The inhibition of Br₂ and I₂ evolution on platinum by phenol***, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1970**, 27, 69-79.
- 35 - Mafatle, T.; and Nyokong, T.; ***Use of cobalt(II) phthalocyanine to improve the sensitivity and stability of glassy carbon electrodes for the detection of cresols, chlorophenols and phenol***, *Analytical Chimica Acta*, **1997**, 354, 307-314.
- 36 - Mulchandani, A.; and Bassi, A. S.; ***Principles and applications of biosensors for bioprocess monitoring and control***, *Critical Reviews in Biotechnology*, **1995**, 15, 105-124.
- 37 - Fatibello-Filho, O.; e Capelato, M. D.; ***Biossensores-Revisão***, *Química Nova*, **1992**, 15, 28, 28-39.
- 38 - Trojanowicz, M.; and Hitchman, M. L.; ***Determination of pesticides using electrochemical biosensors***, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **1996**, 15, 38-45.
- 39 - Ivanov, A. N.; Evtugyn, G. A.; Gyurcsányi, R. E.; Tóth, K.; Budnikov, H. C.; ***Comparative investigation of electrochemical cholinesterase biosensors for pesticide determination***, *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 404, 55-67.
- 40 - Skládal, P.; ***Detection of organophosphate and carbamate pesticides using disposable biosensors based on chemically modified electrodes and immobilized cholinesterase***, *Analytica Chimica Acta*, **1992**, 269, 281-287.
- 41 - La Rosa, C.; Pariente, F.; Hernández, L.; Lorenzo, E.; ***Amperometric flow-through biosensor for the determination of pesticides***, *Analytica Chimica Acta*, **1995**, 308, 129-136.
- 42 - Alcântara, M. M.; ***Biossensor Potenciométrico para a Determinação de Pesticidas Inibidores da Enzima Acetilcolinesterase***. Dissertação de Mestrado. Uberlândia: Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, **2004**.

-
- 43 - Li, J.; Chia, L. S.; Goh, N. K.; Tan, S. N.; ***Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds***, *Analytical Chimica Acta*, **1998**, 362, 203-211.
- 44 - Wang, J. and Li, R.; ***Highly stable voltammetric measurements of phenolic compounds at poly(3-methylthiophene)-coated glassy carbon electrodes***, *Analytical Chemistry*, **1989**, 61, 2809-2811.
- 45 - Solná, R.; Sapelnikova, S.; Skládal, P.; Winther-Nielsen, M.; Carlsson, C.; Emnéus, J.; Ruzgas, T.; ***Multienzyme electrochemical array sensor for determination of phenols and pesticides***, *Talanta*, **2005**, 65, 349-357.
- 46 - Anh, T. M.; Dzyadevych, S. V.; Van, M. C.; Renault, N. J.; Duc, C. N.; Chovelon, J. M.; ***Conductometric tyrosinase biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites***, *Talanta*, **2004**, 63, 365-370.
- 47 - Solná, R.; Dock, E.; Christenson, A.; Winther-Nielsen, M.; Carlsson, C.; Emnéus, J.; Ruzgas, T.; Skládal, P.; ***Amperometric screen-printed biosensor arrays with co-immobilised oxidoreductases and cholinesterases***, *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 528, 9-19.
- 48 - Duran, N.; Rosa, M. A.; D' Annibale, A.; Gianfreda, L.; ***Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: A Review***, *Enzyme and Microbial Technology*, **2002**, 31, 907-931.
- 49 - Klabunde, T.; Eicken, C.; Sacchetti, J. C.; Krebs, B.; ***Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center***, *Nature Structural Biology*, **1998**, 5, 1084-1090.
- 50 - Cabanes, J.; García-Cánovas, F.; García-Carmona, F.; ***Chemical and enzymatic oxidation of 4-methylcatechol in the presence and absence of -serine. Spectrophotometric determination of intermediates***, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1987**, 914, 190-197.

-
- 51 - Notsu, H.; and Tatsuma, T.; ***Simultaneous determination of phenolic compounds by using a dual enzyme electrodes system***, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2004**, 566, 379-384.
- 52 - Besombes, J. L.; Cosnier, S.; Labbé, P.; Reverdy, G.; ***A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides***, *Analytical Chimica Acta*, **1995**, 311, 255-263.
- 53 - Duckworth, H. W. and Coleman, J. E.; ***Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase***, *Journal of Biological Chemistry*, **1970**, 245, 1613-1625.
- 54 - Zachariah, K. and Mottola, H. A.; ***Continuous-flow determination of phenol with chemically immobilized polyphenol oxidase (tyrosinase)***, *Analytical Letters*, **1989**, 22, 1145-1158.
- 55 - Kulys, J.; and Schmid, R. D.; ***A Sensitive Enzyme Electrode for Phenol Monitoring***, *Analytical Letters*, **1990**, 23, 589-597.
- 56- Hedenmo, M.; Narváez, A.; Dominguez, E.; Katakina, I.; ***Improved mediated tyrosinase amperometric enzyme electrodes***, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1997**, 425, 1-11.
- 57 - Wang, J. and Chen, Q.; ***Remote electrochemical biosensor for field monitoring of phenolic compounds***, *Analytical Chimica Acta*, **1995**, 312, 39-44
- 58 - Wang, J.; Fang, L.; Lopez, D.; ***Amperometric Biosensor for Phenols Based on a Tyrosinase-Graphite-Epoxy Biocomposite***, *Analyst*, **1994**, 119, 455-458.
- 59- Narváez, A.; Guinea, M.; Ortega, F.; Dominguez, E.; ***Characterization and optimization of tyrosinase solid graphite electrodes for the detection of phenolic compounds***, *Química Analítica*, **1996**, 15, 83-90.
- 60 - Cosnier, P.; and Popescu, I. C.; ***Poly(amphiphilic pyrrole)-tyrosinase-peroxidase electrode for amplified flow injection – amperometric detection of phenol***, *Analytica Chimica Acta*, **1996**, 319, 145-151.

-
- 61 - Deng, Q.; Guo, Y.; Dong, S.; ***Cyto-hydrogel for the construction of a tyrosinase-based biosensor***, *Analytica Chimica Acta*, **1996**, 319, 71-77.
- 62 - Schiller, J. G.; and Liu, C. C.; ***Immobilization of tyrosinase within polyacrylamide gels***. *Biotechnolology and Bioenergetics*, **1976**, 18, 1405-1412.
- 63 - Adeyolu, O.; Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; Leech, D.; ***High-performance liquid chromatographic determination of phenols using a tyrosinase-based amperometric biosensor detection system***, *Analyst*, **1996**, 121, 1885-1889.
- 64 - Skládal, P.; Nunes, G. S.; Yamanaka, H.; Ribeiro, M. L.; ***Detection of Carbamate Pesticides in Vegetable Samples using Cholinesterase-based Biosensors***, *Electroanalysis*, **1997**, 9, 1083-1087.
- 65 - Voet, D. and Voet, J.G. ***Biochemistry***. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, INC, **2004**, p.1591.
- 66 - Fatibello-Filho, O.; e Vieira, I. C.; ***Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática***, *Química Nova*, **2002**, 25:3, 455-464.
- 67 - Kamim, R. A.; and Wilson, G. S.; ***Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer***, *Analytical Chemistry*, **1980**, 52, 1198-1205.
- 68 - Cosnier, S.; and Innocent C.; ***A new strategy for the construction of a tyrosinase-based amperometric phenol and o-diphenol sensor***, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **1993**, 31,147-160.
- 69 - Bard, A. J.; and Faulkner L. R.; ***Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications***, John Wiley & Sons, **1980**, 227-248.
- 70 - Brett, C. M. A.; and Brett, A. M. O.; ***Eletroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações***. 3^o Ed. Oxford: Oxford University Press, **1993**.

-
- 71 - Ferreira, L. F.; e Albuquerque, Y. D. T.; *Avaliação de Eletrodos de Carbono Modificados com Ftalocianina de Co(II) na Determinação de Compostos Fenólicos*. In: XIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2002, Araraquara /SP. Anais do XIII SIBEE, **2002**.
- 72 - Leznoff, C. C.; and Lever, A. B. P. (Editors) *Phthalocyanines - Properties and Applications*, VCH Verlagsgesellschaft MBH, Weinheim, Germany, **1989**, Chapters 1 and 4.
- 73 - Halbert, M. K.; and Baldwin, R. P.; *Electrocatalytic and analytical response of cobalt phthalocyanine containing carbon paste electrodes toward sulfhydryl compounds*, *Analytical Chemistry*, **1985**, 57, 591-595.
- 74 - Marko-Varga, G.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Ruzgaz, T.; *Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **1995**, 14, 319-328.
- 75 - Rogers, K. R.; Becker, J. Y.; Cembrano, J.; *Improved selective electrocatalytic oxidation of phenols by tyrosinase-based carbon paste electrode biosensor*, *Electrochimica Acta*, **2000**, 45, 4373-4379.
- 76- Rodrigues-López, J. N.; Escribano, J.; García-Cánovas, F.; *A Continuous Spectrophotometric Method for the Determination of Monophenolase Activity of Tyrosinase Using 3-Methyl-2-benzothiazolinone Hydrazone*, *Analytical Biochemistry*, **1994**, 216, 205-212.
- 77 - Nelson, D. L. and Cox, M. M.; *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. New York: Worth Publishers, **2000**, p. 1152.
- 78 - Stanca, S. E.; Popescu, I. C.; Oniciu, L.; *Biosensors for phenol derivatives using biochemical signal amplification*, *Talanta*, **2003**, 61, 501-507.
- 79 - Sigma Production, T7755- Enzyme Assay and T7755 Product Information Sheet, disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/cgi-bin/hsrun/Suite7/Suite/Suite>.

hgx;start=Suite.HsViewHierarchy.run?Detail=Product&ProductNumber=SIGMA-T7755&VersionSequence=1, acesso em 29/06/2004.

- 80 - Li, J.; Chia, L. S.; Goh, N. K.; Tan, S. N.; *Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds*, *Analytical Chimica Acta*, **1998**, 362, 203-211.
- 81 - Vieira, I. C.; and Fatibello-Filho, O.; *Amperometric Biosensor for the Determination of Phenols using a Crude Extract of sweet potato (Ipomoea Batatas (L.) Lam)*, *Analytical Letters*, **1997**, 30, 895-907.