

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ENGENHARIA DO
MEIO AMBIENTE

LÚCIA MÜLLER

BIOSSENSOR A BASE DE LACASE (*PYCNOPORUS SANGUINEUS*) PARA ANÁLISE AMBIENTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Goiânia/GO
- Dezembro, 2008 -

LÚCIA MÜLLER

BIOSSENSOR A BASE DE LACASE (*PYCNOPORUS SANGUINEUS*) PARA ANÁLISE AMBIENTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Disssertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia do Meio Ambiente.

Área de concentração do programa: Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientador: Dr. Eric de Souza Gil – UFG

Co-orientador: Dr. Arnaldo César Pereira - UNICAMP

Goiânia/GO
- Dezembro, 2008 -

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(GPT/BC/UFG)

Müller, Lúcia.

M958b Biosensor a base de lacase (*Pycnoporus sanguineus*) para análise ambiental de compostos fenólicos [manuscrito] / Lúcia Müller. – 2008.

86 f.: il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil; Co-Orientador: Prof. Dr. Arnaldo César Pereira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Engenharia do Meio Ambiente, 2008.

Bibliografia: f.69-78.

Inclui lista de figuras, tabelas, abreviaturas e siglas e de símbolos.

Anexos.

1. Biosensor 2. Compostos Fenólicos 3. Ambiental
4. Amperométrico 5. Lacase. I. Gil, Eric de Souza. II. Pereira, Arnaldo César. III. Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Engenharia do Meio Ambiente.

IV. Título.

CDU: 543.2

LÚCIA MÜLLER

BIOSSENSOR A BASE DE LACASE (*PYCNOPORUS SANGUINEUS*) PARA ANÁLISE AMBIENTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente da Escola de Engenharia Civil da Universidade Federal de Goiás, aprovada em cinco de dezembro de 2008 pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eric de Souza Gil – UFG

Presidente da banca

Prof. Dr. Walclee de Carvalho Melo - UFLA

Examinador

Prof. Dr. Eduardo Queija de Siqueira – UFG

Examinador

AGRADECIMENTOS

Ao CEFETSC (Centro Federal de Educação Tecnológica de Santa Catarina) , sendo representado por todos os servidores, que de algum modo auxiliaram para que este trabalho pudesse ser desenvolvido. Agradeço à todos os colegas da Instituição, pois todos de alguma maneira auxiliaram nesta jornada.

Ao programa PIQDTEC (Programa Institucional de Qualificação Docente para a Rede Federal de Educação Profissional e Tecnológica) da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), sendo representado por seus servidores, nossos agradecimentos.

À UFG (Universidade Federal de Goiás), sendo representada, especialmente, por servidores da EEC (Escola da Engenharia Civil), da Faculdade de Farmácia (às professoras Mariângela Fontes Santiago e Telma Alves Garcia, pelo apoio técnico e didático e aos servidores Dercílio e Vilma pela atenção e carinho dedicados), ao professor Amarildo Otavio Martins (Instituto de Química – UFG), pelo apoio técnico e aos demais servidores da UFG que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho, nossos agradecimentos.

Ao professor Lauro Tatsuo Kubota (UNICAMP) pela disponibilidade do laboratório de Eletroquímica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de biossensores, nossos agradecimentos.

Aos colegas, mestrandos do PPGEMA pelo carinho e companheirismo dedicados, muito obrigado.

Ao senhor João Gil, pela atenção e hospedagem oferecidas, nosso agradecimento.

Aos meus familiares, que cada de seu modo, me auxiliaram nesta jornada, meus agradecimentos. Valmor e Rosana, que tanto auxiliam de diversas maneiras, um agradecimento especial. Gervásio e Sêmia, que não mediram esforços, muito obrigado. Cacilda e Antônio, pela dedicação aos meus filhos João André e Samuel, meu agradecimento. À minha mãe, as palavras à serem ditas não dizem tudo o que deveria, muito obrigado. Ao meu pai, que a muito tempo já partiu, seus ensinamentos não partiram. Aos meus filhos João André e Samuel, agradeço à Deus por permitir que viessem ser meus companheiros.

RESUMO

BIOSSENSOR A BASE DE LACASE (*PYCNOPORUS SANGUINEUS*) PARA ANÁLISE AMBIENTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Diversos compostos fenólicos têm sido considerados como substâncias tóxicas para os seres vivos e, técnicas analíticas convencionais apresentaram algumas limitações na determinação de tais substâncias nos vários tipos de águas. Diante desse contexto, novas técnicas estão sendo desenvolvidas na determinação de diversas substâncias a nível: ambiental, industrial, segurança, saúde e outros. Destaca-se o desenvolvimento de biossensores, que principalmente na última década, teve um crescimento bastante relevante em pesquisas e aplicações nos diversos setores.

Este trabalho, teve então, como proposta o desenvolvimento de biossensores amperométricos, utilizando lacases do fungo *Pycnoporus sanguineus* para determinação de compostos fenólicos em águas naturais e resíduárias.

Biossíntese de lacases, a partir de diversos meios de cultura, foram feitas e determinadas suas atividades em solução em relação aos substratos seringaldazina, catecol e resorcinol. Biossensores foram construídos a partir dos extratos brutos de lacases que tiveram atividades em torno de 2500UL^{-1} em relação à seringaldazina.

Biossensores amperométricos foram construídos a partir de diversas composições de pastas: pasta de carbono lacase (PCL), pasta de carbono lacase albumina sérica bovina (PCLbsa), pasta de carbono lacase glutaraldeído (PCLg) e pasta de carbono lacase quitosana (PCLq), sendo estas pastas aplicadas em eletrodo de trabalho suporte e este usado em determinações amperométricas utilizando técnicas de voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV).

A aplicação de lacases nos biossensores, construídos, mostrou-se com boas atividades em diferentes eletrólitos e em diferentes pHs, apresentando resposta linear, em eletrólito fosfato (pH 7,0), para o catecol na faixa de $2,0 \times 10^{-5}$ a $7,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$, com coeficiente de correlação ($r = 0,99897$). Sendo, portanto recomendável, a aplicação de biossensores à base de lacase do fungo *Pycnoporus sanguineus* na determinação de compostos fenólicos em águas naturais e resíduárias.

Palavras chaves: biossensor, ambiental, lacase, amperométrico, compostos fenólicos.

ABSTRACT

BIOSENSOR THE BASE OF LACASE (*PYCNOPORUS SANGUINEUS*) FOR ENVIRONMENTAL ANALYSIS OF PHENOLICS COMPOUNDS

Several phenolic compounds have been considered as toxic substances and, analytical techniques present some limitations at the determination of such substances at several types of waters. Therefore, new techniques are developed at the determination of substances at level: environmental, industrial, safety, health and others. The biosensors development, that mainly at the last decade, had a quite important improve at researches and applications at the several areas.

This work has as proposition the development of amperometrics biosensors, using fungals laccases *Pycnoporus sanguineus* for determination of phenolics compounds in waters and wastewater.

Laccases byosynthesis, starting from several culture manners, were made and determinated the activities in solution at relation to the substract seringaldazine, cathecol and resorcinol. Biosensors were construed from the rude extracts of laccases that had activities about 2500UL^{-1} with substrat seringaldazyne.

Amperometrics biosensors were construed starting from several compositions of pastes: paste of carbon laccase (PCL), paste of carbon bovine seric albumine (PCLbsa), paste of carbon laccase glutharaldeid (PCLg) and paste of carbon laccase chitosan (PCLq), being these applied pastes in work electrode supports and this used at determinations amperometrics apling techniques of cyclic voltammetric (CV) and differential pulse voltammetric (DPV).

The laccases application at the biosensors, demonstrated excellent activity at different eletrolites and different pHs, demonstrated linear reply, at pH 7.0 (buffer phosphate), for the cathecol between 2.0×10^{-5} to 7.0×10^{-4} molL $^{-1}$, with coeficient correlection ($r = 0,99897$). Therefore, this work recommend, the biosensors application using fungals laccases *Pycnoporus sanguineus* for determination of phenolics in waters and wastewaters.

Key words: biosensor, environmental, laccase, amperometric, phenolics compounds.

ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico)
AchE	Acetil colinesterase
ADN	Ácido desoxiribonucleico
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
BSA	Albumina sérica bovina
CCT	Código genético universal
CV	Curva voltamétrica, voltametria cíclica
CF	Composto fenólico
Da	Unidade de massa atômica unificada, Dalton (u, Da)
DPV	Voltametria de pulso diferencial
EC	Enzima catalizador - EC 1, oxidoredutases
EC	Comunidade européia
EDCs	Compostos com disfunções endrócrinas
Epa	Potencial de pico anódico
Epc	Potencial de pico catódico
EPR	Ressonância paramagnética de elétron
Ipc	Corrente de pico catódico
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada
Lac 1	Lacase 1
Lac 2	Lacase 2
LAS	Alquilbenzeno sulfonatos linear
NHE	Eletrodo normal de hidrogênio
PCBs	Bifenis policlorados
SCE	Eletrodo saturado de calomelano
PC	Pasta de carbono
PCL	Pasta de carbono lacase
PCLbsa	Pasta de carbono lacase albumina sérica bovina
PCLbsag	Pasta de carbono lacase albumina sérica bovina glutaraldeído
PCLq	Pasta de carbono lacase quitosana
PCR	Reação de polimerase em cadeia

pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Série de dados de solubilidade
SPR	Ressonância de superfície de plasma
TDE	Transferência direta de elétrons
TE	Transferência de elétron
T1	Centro de cobre tipo 1 na enzima lacase
T2	Centro de cobre tipo 2 na enzima lacase
T3	Centro de cobre tipo 3 na enzima lacase
ΔE_p	Variação de potencial de pico

LISTA DE SÍMBOLOS

E	Potencial
E^0	Potencial padrão
R	Constante dos gases
z	Número de elétrons
F	Constante de Faraday
a_i	Atividade iônica
T	Temperatura termodinâmica
C	Coulomb
J	Joule
K	Unidade de temperatura Kelvin
nm	Nanômetros
molL^{-1}	Mol por litro
UmL	Unidade de atividade enzimática por mililitro
UL	Unidade de atividade enzimática por litro
mV	Milivolts
V	Volts
mgL^{-1}	Miligrama por litro

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: As três configurações usadas em sensores químicos	20
Figura 2.2: Sistema lacase-mediador.....	26
Figura 2.3: Estrutura tri-dimensional de laccase.....	30
Figura 2.4: Intervalo de potencial ótimo.....	32
Figura 2.5: Mecanismo das reações nos eletrodos.....	34
Figura 2.6: Fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	39
Figura 3.1: Sistema amperométrico para determinação de compostos fenólicos....	43
Figura 4.1: Cultura do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	46
Figura 4.2: Fungo, <i>Pycnoporus sanguineus</i> , formado na biosíntese.....	46
Figura 4.3: Biosíntese de lacases, em substrato, casca de banana.....	47
Figura 4.4: Evolução da atividade, na oxidação da seringaldazina.....	47
Figura 4.5: Reação de oxidação do catecol catalisada pela enzima lacase.....	49
Figura 4.6: Oxidação catalítica do catecol, em diferentes pHs.....	49
Figura 4.7: Reação de oxidação do resorcinol catalisada pela enzima lacase, em diferentes eletrólitos à pH 5,0.....	50
Figura 4.8: Reação de oxidação do catecol, catalisada pela enzima lacase.....	50
Figura 4.9: CV do catecol em tampão acetato.....	54
Figura 4.10: DPV DPV de redução, da quinona a catecol.....	55
Figura 4.11: DPV do catecol em diferentes concentrações de cloreto de sódio	56
Figura 4.12: DPV do catecol em eletrólito acetato de potássio.....	57
Figura 4.13: DPV do catecol em diferentes pHs do eletrólito fosfato.....	58
Figura 4.14: Voltamogramas de Pulso Diferencial do catecol.....	58
Figura 4.15: Voltamogramas cíclicos do catecol.....	59
Figura 4.16: Voltamograma cíclico do catecol, utilizando o eletrodo suporte	60
Figura 4.17: Voltamogramas de Pulso Diferencial do catecol (pH 7,0).....	61
Figura 4.18: Atividades relativas apresentadas com a utilização de lacase.....	62
Figura 4.19: Curva de calibração e voltamogramas de pulso diferencial.....	63
Figura 4.20: Modulação de amplitude.....	65
Figura 4.21: Intervalo de tempo.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Aplicações de sensores químicos	21
Tabela 2.2: Exemplos de sensores químicos comuns	22
Tabela 2.3 – ANEXO A: Biossensores comerciais para aplicações ambientais	80
Tabela 2.4: Importantes propriedades de centros de cobre em várias proteínas	28
Tabela 2.5 - ANEXO B: Características de lacases isoladas de diferentes fontes ..	82
Tabela 2.6 – ANEXO C: Centro de cobre tipo I	84
Tabela 2.7. Respostas relativas de eletrodos modificados com diferentes lacases e bioenzimáticos para compostos fenólicos	33
Tabela 2.8 – ANEXO D: Propriedades de diferentes biossensores.....	85
Tabela 2.9: Formação de atividade extracelular por <i>Trametes pubescens</i>	37
Tabela 3.1: Meio de cultura utilizado para cultivo do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	41
Tabela 3.2: Meios de biossíntese de lacases a partir do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	42
Tabela 3.3: Composição dos eletrodos de Pasta de Carbono modificados com extrato bruto de Lacase (PCLs).....	44
Tabela 4.1: Biossíntese de lacases a partir do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> em meio contendo: 2,5-xilidina, extrato de malte e sulfato de cobre II.....	48
Tabela 4.2: Eficiência relativa de eletrodos modificados com pasta de carbono, testados com catecol.....	52
Tabela 4.3: Dados de Epc e Ipc para redução da quinona formada a partir da oxidação enzimática do catecol em diferentes pHs.....	52
Tabela 4.4: Dados de Epc e Ipc para oxidação do catecol em diferentes eletrólitos (0,1 molL ⁻¹ , pH 5,0).....	53
Tabela 4.5. Estudo da adição e recuperação de catecol em águas residuárias.....	64
Tabela 4.6. Parâmetros de otimização do biossensor com eletrodo suporte PCL2, para soluções de catecol.....	66

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS	14
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.2 JUSTIFICATIVA	16
1.3 OBJETIVOS	18
1.3.1 Objetivo Geral	18
1.3.2 Objetivos Específicos	18
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 SENsoRES QUÍMICOS E SENsoRES ELETROQUÍMICOS	19
2.2 BIOSSENSORES	20
2.2.1 Enzimas como Agentes de Reconhecimento	25
2.3 BIOSSENSORES A BASE DE LACASES	29
2.3.1 Produção de Lacases	36
2.3.1.1 Fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	38
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 EQUIPAMENTOS	40
3.2 REAGENTES	40
3.3 PRODUÇÃO DE LACASES	41
3.3.1 Meio de Cultura Utilizado para Cultivo do Fungo	41
3.3.2 Semeadura e Cultivo do Fungo <i>Pycnoporus Sanguineus</i>	41
3.3.3 Incubação	41
3.3.4 Biosíntese das Lacases	41
3.3.5 Atividade das Lacases	42
3.4 DESENVOLVIMENTO DOS BIOSSENSORES	43
3.4.1 Estudo de Estabilidade e Resposta Relativa	43
3.4.2 Ensaios Eletroquímicos	44
3.4.3 Estudo da Resposta e Aplicação do Biosensor	45
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
4.1 PRODUÇÃO DE LACASES E ENSAIOS DE ATIVIDADE EM SOLUÇÃO	46
4.2 DESENVOLVIMENTO DOS BIOSSENSORES	51
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
GLOSSÁRIO	79

CAPÍTULO 1 – ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS

1.1 INTRODUÇÃO

A crescente conscientização dos efeitos do aquecimento global e a bioconcentração de poluentes levou, conjuntamente, governantes e pesquisadores a adotar medidas para minimizar tais situações. Tem-se enfatizado ao desenvolvimento de estudos de energias renováveis e de sistemas de monitoramento do meio ambiente.

Atualmente existe um consenso universal a respeito da necessidade de monitorar continuamente o teor de contaminantes químicos nos cursos de águas naturais e nos inúmeros efluentes industriais descarregados nestes recursos hídricos. Dentro deste contexto, é importante contar com novas metodologias de determinação e quantificação dos diversos tipos de poluentes, com rapidez, seletividade e sensibilidade, características estas, encontradas nos biossensores (ROSATTO *et al.*, 2001).

Até agora, o monitoramento da qualidade da água tem sido feito em pontos de amostragem seguido por medidas de instrumentação analítica para determinar concentrações de poluentes. Este procedimento tem consideráveis limitações em termos de (i) resolução temporal e espacial que é conseguido a um custo razoável, e (ii) a informação sobre biodisponibilidade que é obtida. A implementação, bem sucedida, da Diretriz Orientadora de Estrutura da Água (2000/60/EC) através dos estados membros da União Européia irá requerer o estabelecimento e uso de ferramentas emergentes e de baixo custo como parte de programas de monitoramento. Estas técnicas devem complementar o monitoramento, fornecendo informações adicionais com o objetivo de obter uma visão mais representativa da qualidade dos corpos d’água. As limitações associadas com a presente prática de monitoramento químico e biológico sugerem a utilização de monitoramento através de biomarcadores e biossensores (ALLAN *et al.*, 2006).

Segundo a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), o biossensor é um instrumento adequado à detecção de compostos químicos utilizando sinais elétricos, térmicos ou ópticos gerados através de reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas, tecidos, ou células inteiras (RASOOLY, 2005).

Biossensores estão sendo desenvolvidos para diferentes aplicações, incluindo controle ambiental, controle de qualidade de alimentos, agricultura, militar e, particularmente aplicações médicas. De fato, muitos biossensores comercialmente disponíveis já são aplicados nos mercados clínico e farmacêutico, consequentemente há

um número maior de pesquisas nesta área. Na indústria alimentícia, a detecção de contaminantes, verificação de conteúdo dos produtos, monitoramento de conversão de materiais naturais, e produtos refrigerados são áreas de aplicação potencial de biossensores. A indústria de bebidas tem identificado maneiras para melhorar e controlar seus produtos através da detecção prévia de materiais perigosos tais como germes ou substâncias de guerra química. A detecção de drogas ilícitas e explosivos, com propósito de segurança nos aeroportos, também é uma área de prioridade de pesquisa em biossensores (RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2004).

Para controle e monitoramento ambiental, biossensores podem fornecer dados rápidos e específicos de áreas contaminadas. Eles oferecem outras vantagens sobre métodos analíticos convencionais tais como: possibilidade de portabilidade e trabalho no local e habilidade de medir poluentes em matrizes complexas com preparação mínima da amostra. Por outro lado, biossensores oferecem a possibilidade de não somente identificar substâncias químicas, mas também seus efeitos biológicos, tais como toxicidade ou efeitos de disfunções endrócrinas (RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2004).

Compostos fenólicos estão presentes em efluentes de diversas indústrias, tais como, de: óleo, tintas, polímeros e farmacêutica e, diversos destes, são tóxicos. Portanto sua determinação no meio ambiente é de grande importância para controle e monitoramento ambiental e, pode ser efetuada através da utilização de biossensores os quais detectam estes compostos em baixas concentrações (10^{-6} – 10^{-10} molL⁻¹) (SEYDA *et al.*, 2008; VAMVAKAKI e CHANIOTAKIS, 2007).

A Resolução Conama 357/2005, atribui condições e padrões para classificação das águas. Em relação às águas doces – classe I, por exemplo, para fenóis totais, o valor máximo permitido é de 3 μ gL⁻¹. Para determinados compostos orgânicos há valores máximos específicos permitidos, por exemplo, 2-clorofenol 0,1 μ gL⁻¹.

Portanto, a tendência futura para biossensores ambientais é usar a nanotecnologia por meio de nanotubos ou nanofibras de carbono para imobilização dos materiais biológicos [enzimas, ADN (ácido desoxirribonucleico), células, etc], com objetivo de obter melhor estabilidade e aumento da sensibilidade. Para sua miniaturização e portabilidade, está recorrendo-se ao uso da bioengenharia, microeletrônica e nanotecnologia (ORTIZ *et al.*, 2007).

Mediadores já foram bastante usados em aplicações analíticas e, nos últimos anos foram amplamente aplicados na elaboração de biossensores baseados em enzimas

oxidases para análises clínica, ambiental e alimentícia (RICCI e PALLESCHI, 2005).

Extensos esforços em pesquisas foram realizados para avaliar as possibilidades oferecidas por enzimas em biotecnologia e aplicações ambientais. Um efetivo uso de enzimas é impedido por algumas propriedades das enzimas tais como sua não reutilização, alta sensitividade para diferentes agentes desnaturantes e presença de efeitos sensoriais ou toxicológicos adversos. Muitas destas limitações indesejáveis são removidas pelo uso de enzimas imobilizadas. Esta pesquisa tem mostrado ser mais vantajosa para catálise que o uso de enzimas livres (DURAN *et al.*, 2002).

De acordo com o banco de dados do ISI Web of KnowledgeSM, 46702 artigos científicos foram publicados contendo a palavra-chave “sensor” ou “sensors”, desde 2000. Estes trabalhos referem-se a investigações com sensores de diversos tipos e incluem transdução potenciométrica, amperométrica, piezoelétrica, óptica, térmica, condutométrica, entre outras (LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006).

Biosensores foram desenvolvidos nos últimos 35 anos e, pesquisas neste campo tornaram-se populares nos últimos 15 anos. Biosensores eletroquímicos são os mais antigos (KISSINGER, 2005).

Entretanto, somente sensores para o analito glicose tem alcançado sucesso comercial. Em relação a esta perspectiva, devemos ter precauções relacionadas às expectativas para biosensores tais como: necessidade de consolidação da ciência e diminuição da ampla lacuna entre a realização acadêmica e comercial para pesquisa de sensores. O objetivo deste comentário não é chegar a qualquer verdade particular, mas algo para estimular a discussão intensamente (KISSINGER, 2005).

Biosensores são muito atrativos para pesquisas acadêmicas. Requerem relativamente poucos investimentos em equipamentos e excelentes para estudantes familiarizarem-se com enzimas, anticorpos, filmes poliméricos, cinéticas, eletroquímica, fibras ópticas, seletividade biológica, aquisição de dados e ciência dos materiais (KISSINGER, 2005).

Um assunto de prioridade para inclusão bem sucedida de técnicas emergentes em programas de monitoramento de águas é promover a comunicação entre cientistas e políticos e, para otimizar a coordenação entre a produção do desenvolvimento científico é necessário pesquisa-política (ALLAN *et al.*, 2006).

1.2 JUSTIFICATIVA

A necessidade de métodos analíticos mais versáteis para o monitoramento

ambiental tem estimulado a produção de uma grande variedade de métodos analíticos. Os biossensores revelam grandes perspectivas quanto a sua utilização no monitoramento “on-line” de efluentes e outras matrizes de interesse ambiental, possibilitando uma rápida adaptação nos processos de tratamento. Pesquisas, realizadas nos últimos anos, mostram que a incorporação de moléculas com atividade biológica em metodologias analíticas com sucesso nos mais variados procedimentos analíticos, principalmente nos que visam à área de controle ambiental, teve um grande aumento (ROSATTO *et al.*, 2001).

Biossensores representam uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas existentes, devido as suas características únicas, tais como: seletividade; relativo baixo custo de construção e estocagem; potencial para miniaturização; facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento rápido, no local. Entretanto, é necessário enfatizar que estas ferramentas não podem e não devem ser vistas como alternativas para técnicas analíticas clássicas, mas sim como um complemento a elas, pois alguns biossensores ainda podem apresentar problemas de estabilidade (ROSATTO *et al.* 2001).

As principais vantagens de um biosensor versus técnicas convencionais de monitoramento ambiental consistem na possibilidade de análise de múltiplos poluentes, miniaturização, e a importante possibilidade de utilização em campo num regime de tempo real (RASOOLY, 2005).

Vários compostos fenólicos são reconhecidos como substâncias tóxicas e desreguladores endócrinos. Estes compostos químicos são de origem natural ou sintética, os quais são capazes de interferir com o sistema endógeno, modulador ou imitador de hormônios naturais. O resultado desta interação para humanos e vida selvagem é a indução de sérias patologias tais como desenvolvimento de anormalidades e carcinogênese. Para estas reações, a determinação de compostos fenólicos em matrizes ambientais, incluindo águas superficiais, tornou-se uma matéria de grande importância (PORTACCIO *et al.*, 2006).

Biossensores amperométricos têm se mostrado viáveis para complementar métodos analíticos na determinação de compostos fenólicos, provendo alternativas para os métodos convencionais, os quais tem muitas desvantagens. O uso e a produção de fenóis são feitos, principalmente pelas indústrias de papel, de polímeros sintéticos, farmacêutica, de plásticos, de corantes, de pesticidas e outras. Fenóis são também liberados no meio ambiente pela degradação de pesticidas com cadeias fenólicas. O

controle do nível de fenóis é muito importante para a proteção do meio ambiente (ROSATTO at al., 2001).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Desenvolver biossensores, a base de enzima lacase, para análise ambiental de compostos fenólicos.

1.3.2 Objetivos Específicos

Este trabalho teve por objetivo:

I - Estudar meios de produção e purificação de enzima lacase utilizando, como fonte, culturas do fungo *Picnoporus sanguineus*, avaliando:

- diferentes métodos de obtenção (temperatura, pH, indutores) /fonte (casca de banana, caldo de batata, meios comerciais);
- relação atividade extrato enzimático *versus* tipo de lacase e forma de obtenção.

II - Desenvolver sistemas de imobilização das enzimas lacase, avaliando:

- relação atividade enzimática *versus* sistema de imobilização das enzimas;
- relação atividade enzimática *versus* influência de uso materiais: quitosana, glutaraldeído e albumina sérica bovina na composição da pasta de carbono.

III - Desenvolver biossensores à base de lacase, avaliando:

- atividade em relação à diferentes compostos fenólicos;
- estabilidade e reproduzibilidade das medidas;
- condições ótimas de resposta;
- concentração-limite de detecção de compostos fenólicos;

IV – Estudar a otimização nos parâmetros de voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV), avaliando:

- velocidade de varredura;
- faixa de potencial;
- potencial de pulso.

V - Estudar a aplicabilidade do biossensor em amostras de águas avaliando:

- taxa de recuperação de compostos fenólicos;
- ânions interferentes: concentração de cloretos.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SENsoRES QUÍMICOS E SENsoRES ELETROQUÍMICOS

Um sensor químico é um dispositivo que responde a um analito particular de maneira seletiva por meio de uma reação química e pode ser usado para determinação qualitativa ou quantitativa do analito. Esta definição abrange todos os sensores baseados em reações químicas incluindo biossensores, os quais são altamente específicos e sensíveis para reações bioquímicas e biológicas para o reconhecimento de espécies. Há duas partes para um sensor químico. Primeiramente, há a região responsável pela seletividade química e então há o transdutor. As reações químicas devem possuir seletividade adequada e podem manifestar-se pela mudança de cor, emissão de luz fluorescente, mudança de potencial elétrico sobre a superfície, fluxo de elétrons, produção de calor ou mudança da freqüência oscilatória de um cristal. O transdutor responde a este sinal e traduz a magnitude do sinal junto a uma medida da quantidade do analito (CATTRALL, 1997; BAKKER e QIN, 2006).

Sensores eletroquímicos se dividem em três categorias: amperométricos, potenciométricos e condutométricos, os quais podem ser de uso singular, intermitente e contínuo (Kissinger, 2005).

Sensor de uso singular: este contém elementos de transdução de sinal em uma célula eletroquímica (ou óptica) completa. Nos casos conhecidos, as medidas ocorrem por cronoamperometria alguns segundos após o início da reação. Tais sensores (incluindo biossensores) são caracterizados pela pouca precisão, relativamente pequena exatidão, baixo limite de detecção para concentrações extremamente pequenas e, um custo total elevado.

Sensor de uso intermitente: estes são comumente usados em sistemas de injeção em fluxo. Sensores (incluindo biossensores) usados desta maneira, freqüentemente apresentam precisão, exatidão e sensibilidade para concentrações até na faixa de nanomolar. O custo é baixo e estes sensores podem ser usados por meses e em repetidas medições. As vantagens se devem ao fato que a corrente de retorno e a calibração são facilmente estabelecidas, para ambos os sensores, eletroquímico e óptico. A hidrodinâmica também favorece o limite de detecção *versus* sensores de solução estacionária.

Sensor de uso contínuo: Neste modelo, os limites de detecção são freqüentemente muito pobres, precisão e exatidão não são facilmente controladas e a resposta de retorno não pode ser determinada junto ao sistema de estudo. No entanto, a

instrumentação é bastante simples e de baixo custo. Estes fatos conferem a este modelo grande destaque comercial, sendo este o mais vendido.

As três configurações ou modelos de sensores estão representadas na Figura 2.1.

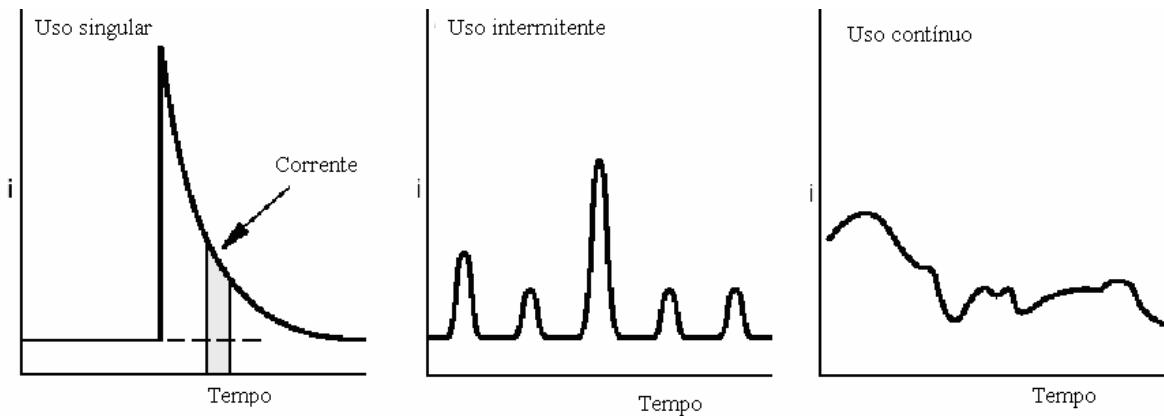


Figura 2.1. As três configurações usadas em sensores químicos (KISSINGER, 1997).

A aplicação de sensores químicos já é utilizada em diversas áreas: indústrias, (ex. controle de processos, controle de qualidade dos produtos, controles ambientais, governamentais (monitoramento de emissões de automóveis, monitoramento de efluentes, etc) e médicas (diagnósticos clínicos). Diante destas aplicações, sensores químicos tem resultado em benefícios econômicos e sociais. Algumas destas aplicações estão na Tabela 2.1 e uma lista de sensores químicos comuns é apresentada na Tabela 2.2 (STETTER *et al.*, 2003).

2.2 BIOSSENSORES

O primeiro biosensor de sucesso foi o de glicose, fabricado pela Exactech em 1987. Atualmente, 90% do uso de biosensores de glicose é em aplicações médicas. Entretanto, em outras áreas tais como na indústria alimentícia, agricultura, militar, veterinária e ambiental há um mercado potencial ainda a ser estabelecido. Muitos dos instrumentos desenvolvidos para o mercado de diagnósticos médicos podem ser adaptados, por exemplo, para o mercado ambiental. Embora os retornos comerciais de biosensores ambientais sejam substancialmente menores do que os de diagnósticos médicos, fundações públicas e órgãos governamentais já desenvolveram pesquisas eficazes sobre a aplicação de biosensores para medidas de poluentes e outros perigos

ambientais (RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2004). Uma lista de biossensores comercialmente disponíveis para determinação de diferentes poluentes está na Tabela 2.3 – ANEXO A.

Biossensores são capazes de efetuar análises: quantitativa ou semi-quantitativa específicas integrando um elemento de reconhecimento biológico com um elemento apropriado de transdução de sinal. Os biossensores amperométricos destacam-se, entre os demais biossensores, pela seletividade do agente de reconhecimento biológico (RASOOLY, 2005).

Tabela 2.1. Aplicações de sensores químicos.

Mercado/aplicação	Exemplos de compostos químicos detectados e classes
Automotivo	O ₂ , H ₂ , CO, NO _x , hidrocarbonetos.
Qualidade do ar em ambiente fechado	CO, CH ₄ , umidade, CO ₂ , compostos orgânicos voláteis.
Alimentos	Bactérias, toxinas de fungos, umidade, pH, CO ₂ .
Agricultura	Umidade, NH ₃ , aminas, CO ₂ , pesticidas, herbicidas.
Médica	Glicose, uréia, O ₂ , CO ₂ , pH, Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ , biomoléculas, H ₂ S, doenças infecciosas, cetonas, gases anestésicos.
Tratamento de água	pH, Cl ₂ , CO ₂ , O ₃ , H ₂ S.
Ambiental	SO _x , CO ₂ , NO _x , hidrocarbonetos, NH ₃ , H ₂ S, pH, íons de metais pesados.
Segurança industrial	Qualidade do ar em ambiente fechado, gases tóxicos, gases combustíveis, O ₂ .
Petroquímica	Hidrocarbonetos, poluentes convencionais.
Aço	O ₂ , H ₂ , CO, poluentes convencionais.
Militar	Agentes explosivos, propelentes.
Aerospacial	H ₂ , O ₂ , CO ₂ , umidade.

Fonte: STETTER *et al.*, 2003.

Tabela 2.2. Exemplos de sensores químicos comuns.

Tipo de sensor	Princípio	Materiais	Analito
Óxido semicondutor	Condutividade de impedância	SnO ₂ , TiO ₂ , ZnO ₂ , WO ₃ , polímeros	O ₂ , H ₂ , CO, SO _x , NO _x , hidrocarbonetos, álcool, H ₂ S, NH ₃ ,
Eletroquímico (eletrólito líquido)	Amperiométrico	compósito Pt, Au catalisador	H ₂ , O ₂ , O ₃ , CO, H ₂ S, SO ₂ , NO _x , NH ₃ , glicose, hidrazina
Eletrodo íon-seletivo (ISE)	Potentiométrico	vidro, LaF ₃ , CaF ₂	pH, K ⁺ , Na ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , F ⁻ , Ag ⁺
Eletrólito sólido	Amperiométrico	YSZ, H ⁺ -condutor	O ₂ , H ₂ , CO, hidrocarbonetos
	Potentiométrico	YSZ, b-alumina, Nasicon, Naffion	O ₂ , H ₂ , CO ₂ , CO, NO _x , SO _x , H ₂ S, Cl ₂ , H ₂ O, hidrocarbonetos
Piezoelétrico	Mecânico w/filme de polímero	Quartz	hidrocarbonetos, compostos orgânicos voláteis
Combustão catalítica	Calorimétrico	Pt/Al ₂ O ₃ , Pt-fio	H ₂ , CO, hidrocarbonetos,
Piroelétrico	Calorimétrico	Piroelétrico + filme	Vapores
Ópticos	Colorimétrico de fluorescência	fibra óptica/indicador de corantes	Ácidos, bases, hidrocarbonetos, materiais biológicos

Fonte: STETTER *et al.*, 2003

De acordo com a natureza do elemento de reconhecimento biológico os biossensores podem ser divididos em dois grandes grupos: biossensores de afinidade e biossensores catalíticos. Nos primeiros, o elemento de reconhecimento biológico interage com o elemento em análise de uma forma estequiométrica, ou seja, a ligação entre ambos segue uma cinética particular e previamente conhecida. Nestes biossensores, os elementos de reconhecimento biológico podem ser ácido desoxirribonucleico (ADN), anticorpos, receptores proteicos, células, tecidos, etc (RASOOLY, 2005).

Uma grande vantagem dos biossensores de afinidade é a possibilidade de análise múltipla, devido à vasta gama de especificidades facilmente obtidas pela combinação de duas unidades de reconhecimento biológico (ex.: anticorpos em imunossensores) (RASOOLY, 2005).

Por outro lado, nos biossensores catalíticos a interação entre o elemento de reconhecimento biológico com o elemento em análise resulta na conversão de um substrato, inicialmente não detectado, num produto mensurável por meios ópticos ou eletroquímicos. Estes elementos de reconhecimento biológico são principalmente enzimas ou microrganismos (bactérias ou leveduras) em geral, alterados geneticamente. A natureza catalítica destes biossensores permite detectar substratos, produtos, inibidores ou modeladores da reação (RASOOLY, 2005).

Quanto ao elemento de transdução de sinal, são vastas as propriedades físicas que podem ser exploradas, no entanto as propriedades eletroquímicas, ópticas e acústicas têm sido mais usadas. O transdutor de sinal encontra-se em contato com o elemento de reconhecimento biológico que interage especificamente com o poluente existente na amostra. Alterações físico-químicas ou bioquímicas resultantes dessa interação são amplificadas e convertidas em sinais elétricos processáveis e quantificáveis (RASOOLY, 2005).

A sensibilidade de um biossensor é dependente da quantidade e natureza do agente de reconhecimento utilizado, dos procedimentos de imobilização e do tempo de utilização. No caso do uso de enzimas como agente de reconhecimento, a especificidade e atividade da enzima podem ser dependentes de sua fonte. Por exemplo, biossensores enzimáticos com lacases do fungo *Polyporus pinsitus* apresentaram melhor resposta do que os biossensores com lacases do fungo *Myceliophthora thermophila* (KULYS e VIDZIUNAITE, 2003).

A tecnologia empregada na imobilização de enzimas pode envolver o uso de novos materiais como polímeros condutores, matrizes sol-gel, membranas seletivas, nanotubos, e outras nanotecnologias, que podem contribuir para aumento da seletividade e sensibilidade. Pesticidas organofosforados foram determinados com nanobiossensores em concentração da ordem de 10^{-10} molL⁻¹ (VAMVAKAKI e CHANIOTAKIS, 2007).

A escolha do sistema de transdução mais adequada ao analito alvo (substrato da enzima) é fundamental. No caso da transdução eletroquímica, substratos contendo grupos hidrolisáveis como éster ou amida podem ser mais facilmente, detectados em sistemas

potenciométricos. Enquanto os substratos eletroativos, susceptíveis a reações de oxido-redução, se encaixam a enzimas oxido-redutases em transdução amperométrica.

Independente do mecanismo de transdução eletroquímica a ser adotado na tecnologia de biosensor, o importante é que esta será mais adequada, se parâmetros de validação analítica como exatidão, seletividade, sensibilidade, repetibilidade e reproduzibilidade das medidas, bem como durabilidade sejam contemplados. Entretanto, já existem exemplos bem sucedidos tais como: o sensor amperométrico de oxigênio e o sensor potenciométrico de pH.

Os sistemas potenciométricos são baseados na medida da diferença de potencial entre **dois eletrodos** imersos em uma solução, um dos quais é sensível ao íon de interesse (eletrodo de **trabalho**), enquanto o segundo mantém o potencial, altamente estável e constante (eletrodo de **referência**). O potencial do eletrodo de trabalho (que pode ser medido por meio de um voltímetro externo) corresponde ao potencial presente na interface formada entre este e a solução analisada, e é proporcional ao logaritmo neperiano da concentração do analito, segundo a equação de Nernst:

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln a_i \quad (1)$$

Onde E é o potencial produzido no eletrodo, E^0 corresponde ao potencial padrão produzido no eletrodo (inclui diversos parâmetros, tais como os potenciais de junção e do eletrodo de referência), R a constante dos gases ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T a temperatura termodinâmica, z o número de elétrons envolvidos no processo, F a constante de Faraday ($96\,485 \text{ C}$) e a_i corresponde à atividade da espécie iônica (LIMA, 1998; CANH, 1994).

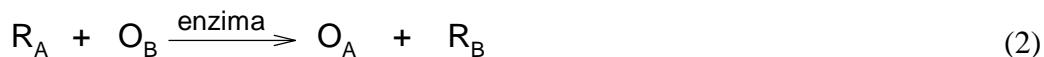
Atualmente, um dos dispositivos potenciométricos mais utilizado é o eletrodo ión-seletivo, constituído por uma membrana semipermeável e seletiva que permite a troca iônica com o analito, formando um potencial (potencial de Donnan) de acordo com a concentração do mesmo (DORF, 2006). Esta troca iônica consiste em uma distribuição desigual de íons entre duas fases separadas por uma membrana semi-permeável, levando à formação de um equilíbrio eletroquímico e, consequentemente, um potencial elétrico é distribuído entre os dois lados da membrana (FERNANDES e KUBOTA, 2001). O potencial formado nesta interface é proporcional ao logaritmo da atividade iônica da espécie na solução (BLUM e COULET, 1991).

A transdução amperométrica baseia-se na determinação de uma corrente, originada a partir de uma reação eletroquímica (oxidação ou redução) na interface

eletrodo solução (BARDELETTI *et al.*, 1991). Assim, a amperometria consiste na determinação da intensidade da corrente sob um determinado potencial aplicado. Esta intensidade é uma função da concentração das espécies eletroquimicamente ativas presentes na amostra. A oxidação ou redução destas espécies geralmente ocorrem no eletrodo de **trabalho**, na presença de um eletrodo de **referência** responsável pela manutenção do potencial (CAHN, 1994). No entanto, para compensar a queda no potencial provocada pela corrente que passa através da solução, ou quando se opera em meios de baixa condutividade (soluções hidroalcoólicas, solventes orgânicos), um sistema de **três eletrodos**, dos quais o terceiro é **auxiliar**, é essencial (LIMA, 1998).

Na detecção amperométrica, aplica-se um potencial capaz de reduzir ou oxidar um analito eletroativo, enquanto a corrente resultante é monitorada em função do tempo.

Vamos assumir uma reação redox catalizada por enzima,



Se R_A é o analito, ele é oxidado por O_B (presente em grande quantidade) para formar O_A e R_B . Ambos o consumo de O_B ou a produção de R_B é determinado como uma indicação do analito R_A (concentração ou quantidade) originalmente presente (KISSINGER, 1997). Os sistemas de detecção podem envolver ainda reações não eletroquímicas conjugadas às reações eletroquímicas, as quais podem relacionar-se com a concentração do analito tanto em função do aumento, quanto com a supressão dos níveis de corrente.

Dentre os materiais de eletrodo que podem ser usados para a construção de biossensores amperométricos, os materiais carbonáceos têm sido os mais utilizados. Estes materiais podem ser divididos em carbono vítreo, grafite pirolítico, pasta de carbono e de grafite compósito. Outros materiais incluem metais nobres tais como: platina e ouro (YAROPOLOV *et al.*, 1994 e CHAILAPAKUL *et al.*, 2006).

2.2.1 Enzimas como Agentes de Reconhecimento

Enzimas são proteínas, com massas moleculares variando entre 5 a 5000 Da (IUPAC, 1997), com valores típicos na faixa de 20 – 100 Da, as quais catalisam reações bioquímicas. Embora estes polipeptídeos sejam formados basicamente, de somente 20

L-aminoácidos comuns, suas estruturas tridimensionais altamente complexas, podem catalisar uma única reação química sob um substrato particular com alta enantioseletividade e enantioespecificidade.

A principal limitação do uso de enzimas como agente de reconhecimento é o alto custo das enzimas particularmente quando usadas em medidas de rotina ou contínuas. Essa desvantagem levou ao uso de enzimas imobilizadas em que uma pequena quantidade de enzima pode ser usada na análise repetitiva de centenas de amostras. A imobilização de enzimas pode ser feita de vários modos, incluindo retenção física em um gel polimérico ou membrana, adsorção física em suportes sólidos nanoestruturados, ligação covalente da enzima a uma superfície sólida ou a polímeros condutores, ou ainda copolimerização da enzima com um monômero adequado (SKOOG *et al.*, 2002; PORTACCIO *et al.*, 2006; DAVIS e HIGSON, 2005).

A tecnologia de imobilização de enzimas tem um efetivo significado para fazer o reuso da enzima e para melhorar sua estabilidade. Lacases foram imobilizadas com bastante sucesso sobre diferentes tipos de suportes, tais como vidro poroso, carbono vítreo, gotas de oxirano acrílico e, membrana de microfiltração hidrofílica. Desta maneira a eficiência catalítica e propriedades de estabilidade da enzima podem ser grandemente melhoradas (JIANG *et al.*, 2005).

A co-imobilização de enzimas com mediadores eletroquímicos pode ser empregada para melhorar a eficiência catalítica da enzima (LIU *et al.*, 2006). Um mediador atua para reduzir a energia necessária para romper barreira da transferência eletrônica. Existem mediadores, essenciais à atividade de uma enzima e, que atuam como co-fatores enzimáticos (MOROZOVA^a, 2007).

Segundo Banci (1999), um mediador (Figura 2.2) é uma pequena molécula que atua como um tipo de carregador de elétrons, que apresenta comportamento eletroquímico reversível e eletrocinética rápida. Após ser oxidado pela enzima, difunde-se para fora do sítio ativo da enzima e então oxida o substrato que, devido ao seu tamanho, não poderia entrar diretamente no sítio ativo da enzima.

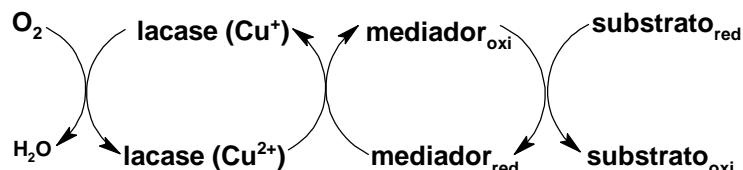


Figura 2.2. Sistema lacase-mediador (modificado de MOROZOVA^a *et al.*, 2007).

Mediadores orgânicos como azul de metileno e azul de meldola, bem como complexos de metais de transição são exemplos de mediadores eletroquímicos.

Muitas proteínas ligam-se, a um ou mais íons metálicos, tais como íons de: Mg, Zn, Fe, Cu, Mn, Co e Mo nos seus estados de oxidação possíveis. Enzimas que ligam-se a íons metálicos são conhecidas como metalo-enzimas. Nestas enzimas o cofator metal é usualmente o sítio ativo da enzima, o qual tem função estrutural ou catalítica (BUGG, 1997). Entre estas metalo-enzimas estão as cuproproteínas de variado potencial redox.

A incorporação de átomos de cobre na estrutura das proteínas permite que as proteínas catalisem reações de transferência de elétrons em diversos processos bioquímicos, devido aos átomos de cobre serem capazes de mudar seus estados de oxidação entre Cu^+ e Cu^{2+} (KIISKINEN, 2005). Cuproproteínas mais complexas são geralmente oxiredutases, isto é, enzimas que catalizam reações de oxiredução. Exemplos destas são: galactose oxidase, lacase, nitrito redutase, ceruloplasmina, fenoxazinona sintetase e ascorbate oxidase (ROSATTO *et al.*, 2001). Estas cuproproteínas podem apresentar 2 ou mais cobres em seu sítio ativo. A Tabela 2.4 apresenta alguns exemplos de enzimas da família das cuproproteínas e respectivas propriedades destes centros metálicos.

Tabela 2.4. Importantes propriedades de centros de cobre em várias proteínas.

Propriedade	Tipo 1 (T1)	Tipo 2 (T2)	Tipo 3 (T3)	Agrupamento
Estado de agregação	Mononuclear	Mononuclear	Binuclear	Trinuclear
Especificidade, função	Transferência de elétron	Catalise e reatividade redox	Ativação do O ₂ para transporte e oxigenação	Ativação do O ₂ para função oxidase
Exemplos	multicobre oxidases	Amina oxidases, citocromo <i>c</i> oxidase, galactose oxidase, superóxido dismutase	Hemocianina, tirosinase	Multicobre oxidases (ascorbato oxidase, bilirubina oxidase, ceruloplasmina, lacase)
Número de coordenação típico	Cu ²⁺ :3 (trigonal-planar)	Cu ²⁺ :4 ou 5 (quadrado-planar ou piramidal)	Cu ⁺ :3 (trigonal-planar)	Cu ⁺ :3 (trigonal) Cu ²⁺ :4
Átomos coordenados	S (Cys), 2N (His), S (Met) ou * (Leu, Phe)	3N (His), *	2×3N (His); Cu ²⁺ : $\mu-\eta^2:\eta^2$ -O ₂ -2 ⁻	N (His); em parte (O)OH ⁻
EPR	Pequena linha ⁶³ Cu/ ⁶⁵ Cu, forte (A _{II}), baixo fator g _{II}	Parâmetros normais de EPR de Cu ²⁺	Nenhum sinal (acoplamento anti-paralelo spin-spin)	Parâmetros normais de EPR de Cu ²⁺
Absorção de luz	Intensa absorção no visível, LMCT (Cys→Cu ²⁺)	Nenhuma intensa absorção campo ligante de interações “proibido”	Intensa absorção; LMCT (O ₂ ²⁻ →Cu ²⁺)	Intensa absorção; LMCT (O ₂ ²⁻ →Cu ²⁺)

Notas: (*) sítio de coordenação livre, ligante especial (radical orgânico) ou outros centros de metal. De acordo com Shleev *et al.*, 2005^b com algumas mudanças.

2.3 BIOSSENSORES A BASE DE LACASES

As lacases são cuproproteínas do pequeno grupo de enzimas chamadas cuproproteínas azuis, cuprooxidases azuis ou ainda apenas oxidases azuis (ROSATTO *et al.*, 2001). Usualmente contém quatro átomos de cobre por monômero, coordenados por ligantes formando uma estrutura tridimensional (Figura 2.3), os quatro átomos de cobre diferem entre si por seus estados de oxidação, os quais são classificados em três tipos, nomeados como T1, T2 e T3 (MOROZOVA^a *et al.*, 2007).

Este tipo de enzima encontra-se amplamente distribuída na natureza. Lacases foram isoladas a partir de plantas, insetos, bactérias e fungos. Embora os centros de cobre sejam similares para todas as lacases de fungos, diferenças significantes nas propriedades termodinâmicas e cinéticas são observadas em função do microorganismo de origem (ROSATTO *et al.* 2001).

Mais que 100 lacases foram isoladas e caracterizadas de várias maneiras. Lacases são glicoproteínas, na maior parte, com massa molecular entre 50–130Da (Tabela 2.5 - ANEXO B).

O cobre T1 é responsável pela cor azul da enzima e tem uma absorbância na região de 610nm. O cobre T2 não pode ser detectado espectrofotometricamente, entretanto, gera um sinal característico em EPR. O Cobre bi-nuclear T3 é diamagnético. Apresenta uma banda de absorbância na região de 330nm e também um espectro de fluorescência (SHLEEV *et al.*, 2005^a).

Em relação ao potencial de T1, todas as oxidases contendo cobre são divididas em três grupos: enzimas de alto, médio e baixo potencial. Lacases de baixo potencial incluem enzimas com potenciais de T1 abaixo de 430 mV; médio potencial , 470-710 mV; e alto potencial, acima de 710 mV. Acredita-se que o principal fator determinante da habilidade da enzima clivar estruturas não-fenólicas da lignina é o potencial redox do centro T1 (MOROZOVA *et al.*, 2007).

A chave característica da lacase é o potencial redox padrão do sítio T1 (Tabela 2.6 – ANEXO C). Os valores deste potencial redox em diferentes lacases encontram-se entre 430 e 790mV *versus* o eletrodo normal de hidrogênio (NHE) como determinado, usando titulações potenciométricas com mediadores de reações de oxiredução. Tem sido mostrado que o sítio T1 é o centro primário, o qual elétrons do substrato oxidado são aceitos (SHLEEV *et al.*, 2004).

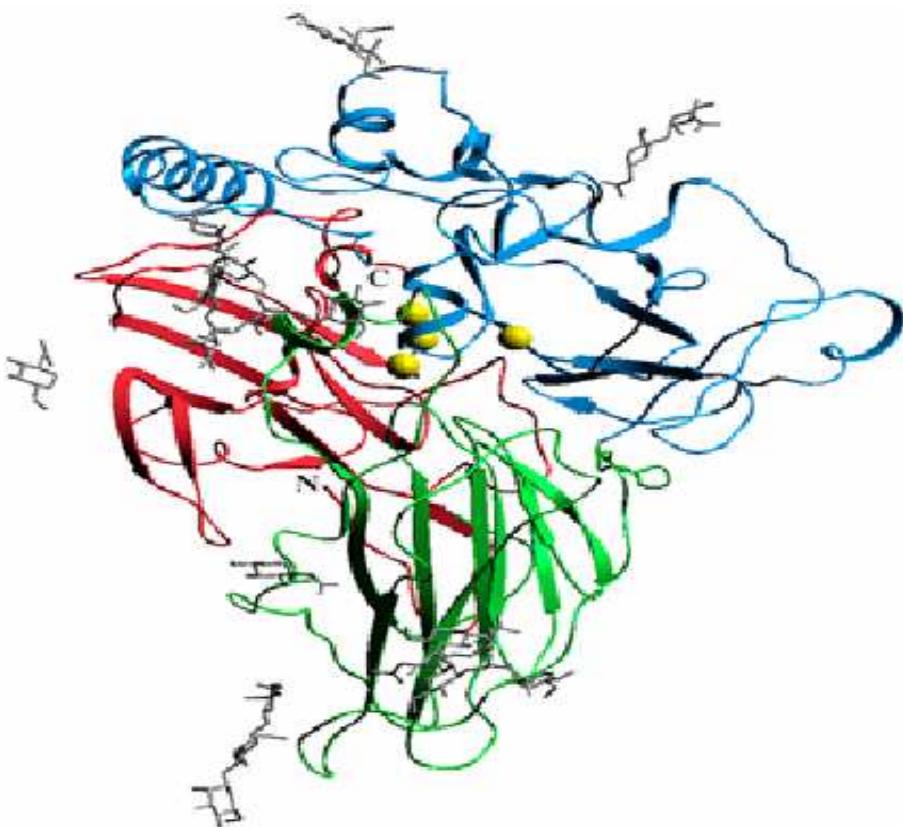


Figura 2.3. Estrutura tri-dimensional de laccase de *M. albomyces* (III, reproduzido com permissão de Nature Publishing Group). As regiões coloridas de vermelho, verde e azul correspondem aos ligantes: histidina imidazol e grupo sulfidrill de cisteína. Os quatro átomos de cobre estão mostrados como bolas amarelas e carboidratos como arcos cinza (modificado de KIISKINEN, 2005 e MOROZOVA^a et al., 2007).

O ciclo catalítico das lacases compreende três principais passos: 1) redução do cobre tipo 1, pelo substrato (analito); 2) transferência eletrônica interna do cobre tipo 1 para os cobres tipos 2 e 3; 3) redução de oxigênio molecular para água através de sua interação com os cobres de tipo 2 e 3 (ROSATTO *et al.* 2001).

O uso de lacase para transformar compostos tóxicos em metabólitos seguros tem sido uma alternativa viável para reduzir a poluição ambiental, mas há vários fatores que limitam esta aplicação para enzimas livres, pois estas podem ser desativadas ou desnaturadas quando submetidas às severas condições encontradas nos solos ou efluentes. As imobilizações de enzimas em diversos suportes através de processos físicos ou químicos podem minimizar estas limitações, tornando-as mais estáveis e

aplicáveis por um maior período de tempo. A ampla gama de substratos sobre os quais as lacases podem atuar é uma característica que direciona para o emprego das mesmas na biorremediação, bem como desenvolvimento de biossensores (GARCIA et al., 2006).

Os substratos orgânicos de lacases podem ser divididos em três grupos: compostos *ortho*-, *meta*- ou, *para*- substituídos com um par de elétrons livres. Compostos *ortho*-substituídos (por exemplo, catecol, guaiacol, *o*-fenilenediamina, pirocatecol, dihidroxifenilalanina, pirogalol, ácido cafeico, ácido gálico, e ácido protocatechuico) são os melhores substratos para a maioria das lacases seguidos dos *para*-substituídos (*p*-henilenodiamina, *p*-cresol, e hidroquinona) e compostos *meta*-substituídos (*m*-fenilenodiamina, orcinol, resorcinol, e floroglucina). Separadamente de compostos orgânicos, lacases catalisam a oxidação de alguns íons inorgânicos tais como: $\text{Mo}(\text{CN})_8^{4-}$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, $\text{Os}(\text{CN})_6^{4-}$, e $\text{W}(\text{CN})_8^{4-}$. Elas oxidam Mn^{2+} na presença de agentes quelantes (MOROZOVA^a et al., 2007).

Lacase é o grupo de enzimas mais promissor para descontaminar sistemas poluídos com fenóis e para aplicações biotecnológicas. Este grupo é utilizado em uma variedade de aplicações, tais como: remover compostos tóxicos de sistemas aquáticos, produzir e tratar água potável, ferramentas analíticas como biossensores para prever a quantidade de fenóis em fontes naturais. Por outro lado, o uso de mediadores pode estender a capacidade oxidativa a compostos não fenólicos como álcool veratrílico ou 1,2-dimetoxibenzeno, os quais requerem potenciais de redução maior que 1,4 V (GIANFREDA et al. 1999). A reatividade de compostos aromáticos e heterocíclicos são dependentes da natureza e posição dos substituintes e o efeito de substituintes sobre a oxidação destes compostos é devido aos fatores eletrônico e espacial (SHUMAKOVICH, 2006).

Compostos fenólicos são amplamente usados por indústrias de papel, plásticos, resinas, corantes e pesticidas. Estes processos geram grande volume de compostos fenólicos nos seus efluentes os quais exibem diferentes toxicidades. Assim, as determinações são muito importantes, devido a toxicidade e persistência no meio ambiente. Espectrofotometria, cromatografia gasosa, cromatografia líquida e eletroforese capilar são métodos comumente usados para a determinação de compostos fenólicos, entretanto, estes métodos são demorados incluem pré-tratamento. Em adição, os equipamentos são caros e geralmente não são passíveis de serem configurados em modelos portáteis. Logo, há um interesse no desenvolvimento de sistemas simples, sensíveis, específicos, precisos e portáteis tais como biossensores para determinação de

compostos fenólicos (ABDULLAH et al., 2007 e RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2004).

Fenóis podem ser determinados amperometricamente através de uma oxidação eletroquímica direta. Entretanto, este procedimento possui uma série de desvantagens, principalmente, devido a uma alta sobrevoltagem. O alto potencial aplicado provoca uma grande corrente de fundo, e consequentemente, um alto nível de ruído. Além disso, nas oxidações diretas de fenóis, grande número de reações paralelas pode ocorrer, levando principalmente a formação de produtos poliméricos que passivam a superfície do eletrodo (ROSATTO *et al.*, 2001).

Biossensores amperométricos podem minimizar estes obstáculos na determinação de fenóis, uma vez que operam com um baixo potencial aplicado em relação a um eletrodo de referência, o qual mede a corrente gerada pela reação biocatalisada de oxidação ou redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo, que de um modo geral, processam-se em potenciais ao redor de 0,0 mV. Nesse potencial, a contribuição de espécies interferentes (facilmente oxidadas ou reduzidas) é minimizada, (Figura 2.4) (ROSATTO *et al.*, 2001). Compostos fenólicos podem ser determinados através da redução eletroquímica das respectivas quinonas, formadas através de catálise enzimática, sendo estas enzimas (fenoloxidases, por exemplo: lacase), immobilizadas em um transdutor amperométrico.

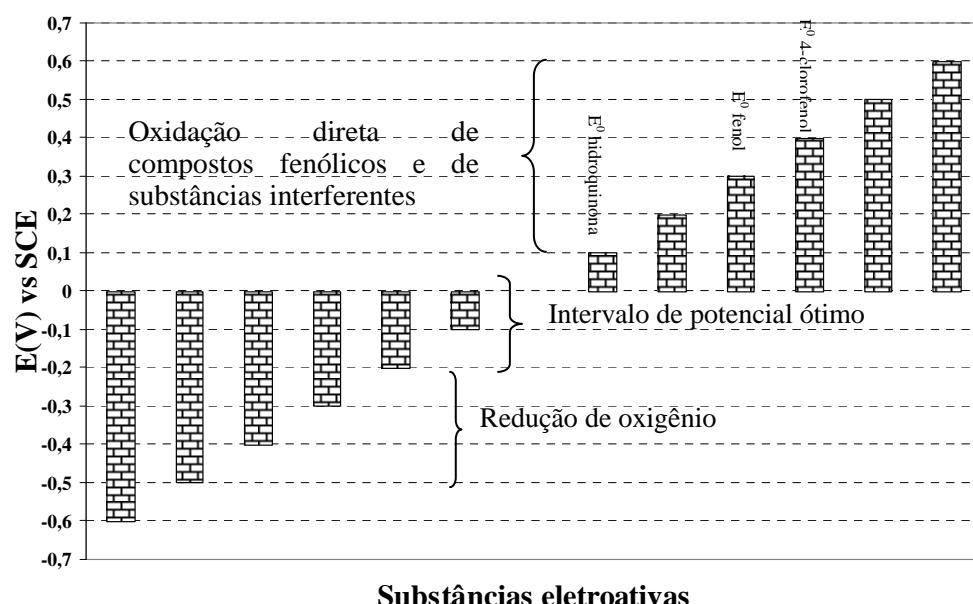


Figura 2.4. Intervalo de potencial ótimo para a operação de biossensores amperométricos (Modificado de ROSATTO *et al.*, 2001).

A maior parte das investigações sobre os mecanismos dos biossensores enzimáticos foram realizadas usando eletrodos de grafite sólido, devido a uma maior eficiência. As respostas relativas dos eletrodos de grafite modificados, através de diferentes enzimas para vários compostos fenólicos são apresentadas na Tabela 2.7 (ROSATTO *et al.*, 2001 e YAROPOLOV *et al.*, 1995).

Tabela 2.7. Respostas relativas de eletrodos modificados com diferentes lacases e bienzimáticos para compostos fenólicos.

Composto fenólico	Agente de Reconhecimento (resposta relativa (%))			
	Lacase (<i>Rigidoporus lignosus</i>) ¹	Lacase (<i>Coriolus hirsutus</i>) ²	tirosinase ³	lacase/tirosinase ⁴
Benzeno-1,4-diol ou (1,4-Hidroquinona) ou hidroquinona	100	100	0.05	15.9
Benzeno-1,2-diol ou (1,2-Hidroquinona) ou catecol	37	100	100	100
Benzeno-1,3-diol ou Resorcinol		0.6	0.03	0.05
Fenol		0.6	5.6	10.6
3,4,5-trihidroxibenzóico ou ácido gálico	50			
3-metoxibenzeno-1,2-diol ou (Pirogalol 1-metiléter)	290			
1,4-Hidroquinona-1-metiléter	1			
(2Z)-3-(3,4-ácido dihidróxifenil)acrilico ou ácido cafeico	328			
2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-cromen-4-ona ou quer cetina	244			
2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2H-cromeno-3,5,7-triol ou catequina	61			
1,2,3-trihidroxibenzeno ou Pirogalol	180			
Ácido 3-metóxi-4-hidroxibenzóico ou ácido vanílico	59			
Ácido (E)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)prop-2-enóico ou ácido ferúlico	11			
4-Metilfenol ou p-Cresol	17.9	2.8	11.1	
4-clorofenol ou p-Clorofenol	2.4	1.4	2.2	
Sulfato de tert-butil-[2-(3,5-dihidroxifenil)-2-hidroxietil]azanium ou sulfato de Terbutalina	0.2	0.01	–	
2-Amino-4-clorofenol	16.8	–	12.3	
2-Clorofenol	0.01	0.01	0.01	

Fonte: 1 - (VIANELLO *et al.*, 2004); 2, 3 e 4 - (YAROPOLOV *et al.*, 1995).

As enzimas redox lacase, tirosinase e peroxidase são as mais utilizadas para a construção de biossensores amperométricos para fenóis. Mesmo estas enzimas possuindo diferentes mecanismos de ação, suas atuações em biossensores amperométricos para a detecção de compostos fenólicos têm sido esquematizadas como uma seqüência de reações similares, conforme mostra a Figura 2.5.

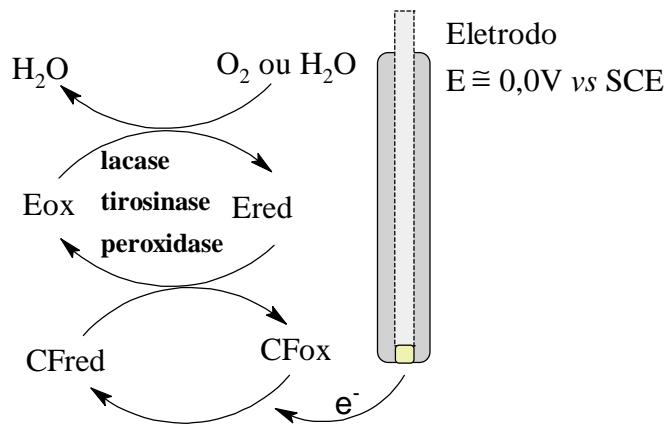
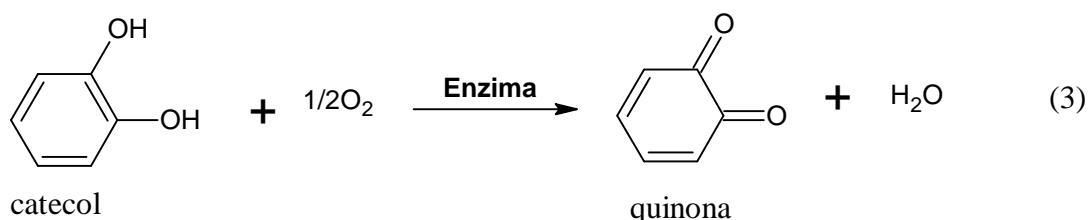


Figura 2.5. Mecanismo das reações nos eletrodos modificados pelas enzimas para a determinação de compostos fenólicos. Ered e Eox são as formas reduzida e oxidada, respectivamente das enzimas; CF = composto fenólico (modificado de ROSATTO et al., 2001).

Lacases, benzenodiol oxigênio oxireduases (EC 1.10.3.2), catalisam a oxidação de ortodifenóis (Eq. 3) e paradifenóis, aminofenóis, polifenóis, poliaminas, ligninas e aril diamina, bem como alguns íons inorgânicos acoplados à redução do oxigênio molecular à água (MOROZOVA^a et al., 2007).



Os efeitos de amplitudes de pulso e velocidade do potencial de varredura, sobre a resposta de um biossensor de lacase do fungo *Pleurotus ostreatus*, para $2,8 \times 10^{-4}$ mol. L⁻¹ de hidroquinona em 0,1 molL⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,0), foram estudados. Nestas condições experimentais, um alto sinal analítico com boas condições para o voltamograma de pulso diferencial foi obtido (LEITE et al., 2003).

Odaci e colaboradores (2007) desenvolveram biossensores baseados em lacase do fungo *Trametes versicolor* para determinação de ácidos fenólicos. Encontraram condições ótimas de trabalho a pH 4,5 e 5.10^{-2} molL⁻¹ de tampão acetato na temperatura de 35°C usando-se lacase com eletrodo modificado de oxigênio. Realizaram parâmetros de calibração analítica, estudos de reproduzibilidade, incluindo aplicação de amostras, para dois eletrodos de lacase modificados.

Lacase do fungo *Trametes versicolor* foi imobilizada sobre eletrodos de fibra de carbono usando métodos clássicos: adsorção física, glutaraldeído, carboimida e carboimida/glutaraldeído. A melhor resposta do biossensor foi obtida usando carboimida/glutaraldeído para acoplar a lacase aos grupos carboxilas sobre fibras de carbono. Neste método, diferentes percentagens de glutaraldeído tiveram importantes efeitos sobre a sensitividade do biossensor, a melhor percentagem de glutaraldeído sendo 10% (m/v). O comportamento do biossensor foi investigado em termos de sensitividade, faixa operacional, pH e potencial aplicado. O biossensor desenvolvido mostrou uma resposta ótima em pH 5,0 a um potencial aplicado de -100mV (FREIRE, *et al.*, 2001).

Vianello *et al.* (2004) elaboraram um biossensor de lacase de *Rigidoporus lignosus* para análise de substratos fenólicos de efluente de indústria de óleo vegetal e, devido à baixa especificidade da lacase aos substratos, o biossensor pode ser usado para detectar a concentração total de fenóis em águas residuárias com uma velocidade de processamento de 20 amostras/h. A incubação das amostras com boridreto de sódio, como etapa de preparação, evitou a necessidade de medidas de branco, melhorando a rapidez de análise com biossensor.

Estudos eletroquímicos de lacases dos basidiomicetos: *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea*, *Coriolopsis fulvocinerea*, *Cerrena maxima* e *Cerrena unicolor*, foram feitos. Por eletroquímica direta (sem mediadores), a imobilização de lacases sobre eletrodos de grafite foi investigada com voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada bem como potenciometria. Para todas as técnicas aplicadas a estes biossensores, foi registrado alto potencial de transferência direta de elétrons (TDE) com eletrodo de grafite espectrográfico e grafite pirrolítico. As características de reações de TDE das enzimas foram analisadas em condições aeróbicas e anaeróbicas (SHLEEV *et al.*, 2005^c).

A voltametria cíclica foi empregada no estudo do comportamento eletroquímico da lacase imobilizada em transdutores de disco de ouro. Este estudo permite avaliar os

pares de oxidação e redução redox da enzima e, consequentemente as faixas de potencial de trabalho onde há melhor interferência e maior estabilidade. As curvas voltamétricas (CVs) obtidas em condições anaeróbicas para lacase de *T. ochracea* continha somente um único alto valor de potencial de transferência de elétron (TE) a +857 mV *versus* NHE. O processo foi mais claramente pronunciado quando a velocidade de varredura foi alta. Semelhantes CVs foram obtidas para lacase de *C. maxima*, entretanto as CVs de lacase de *T. hirsuta* contendo dois bem-pronunciados processos de TE à +486 e + 903 mV *versus* NHE. Notaram que a curva de CVs para lacases adsorvidas sobre eletrodo de ouro puro, depende fortemente do tempo deixado para adsorção das enzimas, bem como as concentrações das enzimas. Quando uma baixa concentração de lacase de *T. hirsuta* foi usada, somente um pico de alto potencial redox do processo à aproximadamente +900 mV foi observado, entretanto no caso de uma alta concentração da enzima (18 mg/mL) e 1h de adsorção um baixo potencial redox bem-pronunciado do processo foi também observado. Estes resultados mostram que lacases de diferentes fontes apresentam diferenças de comportamento eletroquímico. Destaca-se ainda que, ambos, o tempo de adsorção e a forte concentração da enzima afetam tanto a orientação da lacase na superfície quanto a desnaturação parcial da enzima sobre o eletrodo (PITA *et al.*, 2006).

Biossensores baseados em lacase são simples, rápidos para preparar, confiáveis, e de baixo custo. Vários outros autores também utilizaram lacase na confecção de biossensores, sob condições diversificadas de temperatura, pH, métodos de imobilização, fontes de lacase e elementos físicos de transdução de sinal (Tabela 2.8 – ANEXO D).

O uso do extrato bruto de lacases na preparação de biossensores é mais simples e mais rápido do que utilizar enzimas isoladas, além de apresentar propriedades analíticas importantes e também ter boa estabilidade e elevado tempo de vida, quando conservado adequadamente (LEITE *et al.*, 2003).

2.3.1 Produção de Lacases

A produção de lacase pode ser consideravelmente melhorada por uma variedade de substâncias, incluindo compostos aromáticos ou fenólicos tais como xilidina ou p-anisidina, álcoois alifáticos, ou extratos aquosos de plantas (GALHAUP e HALTRICH, 2001).

O aumento na atividade da lacase em resposta a íons metálicos, especialmente o cobre, também tem sido observado (Tabela 2.9). Um importante efeito do cobre sobre

síntese de lacase em *Trametes versicolor* e *Pleurotus ostreatus* foi descrito por (GALHAUP e HALTRICH, 2001).

Estudos mostraram que a regulação da síntese de diferentes isoformas de lacases pelo cobre ocorre no nível de transcrição de gene. O cobre também é um micronutriente para outros organismos vivos (GALHAUP e HALTRICH, 2001), e a exigência de cobre pelos microorganismos é usualmente satisfeita por concentrações muito baixas do metal, na ordem de $1\text{-}10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Tabela 2.9. Formação de atividade extracelular por *Trametes pubescens* MB 89 na presença de vários indutores de lacase. Os indutores foram adicionados em meio baseado em glicose no quarto dia de cultivo em concentrações de $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O cultivo foi feito em frascos com agitação à 25°C e 110 rpm por 13 dias. Valores representam experimentos em duplicata $\pm\text{SD}$. A referência média contém 0,5% de etanol adicionado ao meio de glicose para consideração. O etanol foi usado para dissolver os vários compostos aromáticos.

Suposto indutor	Peso micelial líquido (mg/mL)	Atividade da lacase	
		(U/mL ^a)	(U/mg ^b)
Referência	4.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.3	0.50
<i>p</i> -Anisidina	3.4 \pm 0.1	2.8 \pm 0.2	0.82
Catecol	3.7 \pm 0.0	3.4 \pm 0.2	0.92
Ácido gálico	4.4 \pm 0.0	4.4 \pm 0.5	1.00
Guaiacol	3.9 \pm 0.2	4.4 \pm 0.3	1.13
Ácido tântico	3.7 \pm 0.1	2.5 \pm 0.7	0.68
2,5-Xilidina	4.7 \pm 0.6	8.0 \pm 0.6	1.70
Ag ⁺	0.9 \pm 0.3	0.04 \pm 0.01	0.04
Cd ²⁺	0.9 \pm 0.2	0.01 \pm 0.001	0.01
Cu ²⁺	4.2 \pm 0.4	47.5 \pm 4.8	11.3
Hg ²⁺	0.9 \pm 0.2	0.13 \pm 0.01	0.14
Mn ²⁺	5.9 \pm 0.5	10.6 \pm 1.4	1.80
Zn ²⁺	4.0 \pm 0.6	0.31 \pm 0.09	0.08

^aFormação volumétrica de lacase, unidades formadas por mL de fluído de cultura.

^bFormação específica de lacase, unidades formadas por miligrama de massa líquida de micélio.

Fonte: GALHAUP e HALTRICH, 2001.

Se presente em altas concentrações na sua forma cúprica livre é extremamente tóxico para células microbianas. A ligação do cobre no fungo é tipicamente compreendida por duas fases: primeiro um metabolismo-independente de superfície,

seguido por uma afluência de energia-dependente do metal (GALHAUP e HALTRICH, 2001).

Galhaup e Haltrich (2001) determinaram a atividade da lacase do fungo *Trametes pubescens* MB 89, quando este, desenvolveu-se em meio baseado em glicose suplementado com vários supostos indutores e, transcorrido um tempo de 13 dias. Estes indutores incluem compostos aromáticos (p-anisidina, catecol, ácido gálico, guaiacol, ácido tântico e 2,5-xilidina) bem como diferentes íons metálicos (Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}), alguns dos quais são conhecidos por impor um estado de tensão oxidativa sobre o micélio. Garcia e colaboradores (2006), concluiu que o sal de mercúrio HgCl_2 diminuiu a atividade das lacases de *Pycnoporus sanguineus* e, a inibição enzimática pelo íon Hg^{2+} sugere a presença de grupos sulfidril essenciais para atividade da enzima.

É muito interessante encontrar novas maneiras na produção de lacase com alta atividade e baixo custo devido ao enorme potencial que esta enzima oferece para o desenvolvimento de processos eficientes de biotecnologia (biodescoloração, tratamento de águas residuárias, etc.). A disponibilidade e baixo custo dos substratos são critérios de grande importância na produção de lacases. Tem-se utilizado de resíduos da agricultura, da silvicultura e da indústria alimentícia nos processos de fermentação de estado sólido. O uso de tais resíduos como substratos alternativos ajuda a resolver problemas ambientais, os quais são causados pela disposição deles no meio ambiente. Por outro lado estes resíduos possuem lignina e/ou celulose e hemicelulose, os quais agem como indutores das atividades lignolíticas. Muitos deles possuem açúcares, os quais tornam os processos mais econômicos. Neste contexto, cascas de banana foram utilizadas, pois possuem alto teor (59,51g/100g) de carboidratos que são facilmente metabolizados por microorganismos (OSMA et al., 2006).

2.3.1.1 Fungo *Pycnoporus sanguineus*

Pycnoporus sanguineus é um fungo saprofítico de crescimento lento comumente conhecido como "orelha de pau" e faz parte da Família Polyporaceae, Aphylophorales, Basidiomycetes. Esta espécie sintetiza uma variedade de metabólitos: lacases, pigmentos de coloração vermelho-alaranjado característicos do tipo 2-amino fenoxazina, esteróis, etc. Entre os diversos pigmentos já isolados e identificados, a cinabarina, o ácido cinnabarínico e a tramesanguina são os mais abundantes. Atividades antiparasitária e/ou antiviral, dessas substâncias, foram testadas. A cinabarina reduziu em 4 vezes o título do vírus rábico (SILVA et al., 2001). Este fungo é capaz de

hidrolisar os polissacarídeos da parede celular e também a lignina de materiais celulósicos. *Pycnoporus sanguineus* foi utilizado com sucesso na descoloração de efluente Kraft e na descoloração de diferentes corantes. O *Pycnoporus sanguineus* é um fungo amplamente distribuído na natureza sendo encontrado em regiões de clima ameno (Figura 2.6) e em florestas tropicais como a floresta amazônica (GARCIA et al., 2006).

Alves e colaboradores (2006) testaram em laboratório a resistência natural de espécies de madeiras na região amazônica a fungos apodrecedores. Todas as espécies testadas apresentaram-se muito resistentes aos fungos apodrecedores *Pycnoporus sanguineus* e *Gloeophyllum trabeum*, de decomposição branca, exceto *Aspidosperma desmanthum* que mostrou ser resistente ao fungo de decomposição parda. Segundo Alves e colaboradores (2006), a resistência à deterioração pode ser atribuída em grande parte à presença de taninos e outras substâncias fenólicas complexas, presentes na madeira, as quais são tóxicas a determinados fungos xilófagos.



A

B

Figura 2.6. Fungo *Pycnoporus sanguineus*. (A) Localização: município de Rancho Queimado – SC – Brasil; (B) Reserva Ecológica Serra do Tabuleiro, Município de Palhoça – SC – Brasil.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro UV-visível Micronal (modelo B582) com célula de plástico de 1 cm foi utilizada para ensaios de atividade enzimática de lacases do fungo *Pycnoporus sanguineus*.

- Os experimentos eletroquímicos foram executados num potenciómetro/galvanômetro Autolab (modelo PGSTAT 30), disponível na Universidade Estadual de São Paulo (campus São Carlos) e num potenciómetro μ Autolab disponível na Faculdade de Farmácia da UFG.

- A filtração do extrato bruto de lacase foi efetuada com auxílio de bomba de vácuo modelo nº WP111580, marca Millipore.

- Capela de fluxo laminar (adquirida de Marconi: equipamentos para laboratório), foi utilizada para repique dos fungos e aplicação dos fungos nos meios de biossíntese lacases.

- Autoclave marca Bio-Eng, modelo A75, foi utilizada para esterilização dos meios de cultura dos fungos e meios de biossíntese de lacases.

- Estufa de incubação com agitação.

3.2 REAGENTES

Os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções foram preparadas com água purificada pelo sistema Milli-Q (Modelo UV Plus Ultra low Organics Water). Soluções $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de vários compostos fenólicos (Sigma S/A) foram preparadas em tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

- A solução de seringaldazina (marca Sigma), foi preparada através da dissolução em etanol 99,8% (v/v) na concentração de $1,0 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$.

- Os reagentes, todos de pureza analítica, ácido fosfórico e ácido sulfúrico (Carlo Erba); biftalato de potássio, nitrato de potássio, sulfato de potássio e ácido nítrico (Fluka); cloreto de potássio (Gibco); ácido clorídrico (Sigma); hidróxido de sódio (Aldrich); ácido acético, cloreto de sódio e hidróxido de potássio (Merck) foram utilizados na preparação das soluções eletrolíticas.

- Glicose (marca: Isofar) e ágar-agar microbiology (marca: Merck) foram utilizados para preparo do meio de cultura dos fungos.

- Sulfato de cobre II (marca: Cromoline), foi utilizado como indutor de lacase.

- Cascas de banana nanica (nome popular no centro-oeste do Brasil) ou caturra (nome popular no sul do Brasil), foram utilizadas como substrato na biossíntese de lacases.

3.3 PRODUÇÃO DE LACASES

Para produção de lacase a partir de cultura do fungo *Pycnoporus sanguineus*, utilizou-se a linhagem do fungo *Pycnoporus sanguineus*, CCT-4518 (Linnaeus ex Fries) Murrill, adquirida da Fundação André Tosello em Campinas/SP.

3.3.1 Meio de Cultura Utilizado para Cultivo do Fungo

Os componentes do meio de cultura utilizados para crescimento do fungo *Pycnoporus sanguineus* encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Meio de cultura utilizado para cultivo do fungo *Pycnoporus sanguineus*.

Meio de cultura		
Caldo de batata	40 mL	Para 4 placas de cultivo do fungo. Dividiu-se os 120 mL equitativamente nas 4 placas.
Glicose	2g	
Agar	1,5g	
Água destilada	q.s.p.120 mL	

3.3.2 Semeadura e Cultivo do Fungo *Pycnoporus Sanguineus*

Para semeadura, inóculos de aproximadamente 1cm², contendo micélios do fungo *Pycnoporus sanguineus*, foram adicionados ao centro das placas de cultivo contendo meio solidificado com ajuda de uma ponteira e sob condições assépticas.

3.3.3 Incubação

O fungo permaneceu em crescimento durante sete dias sob condições ambientes.

3.3.4 Biossíntese das Lacases

Diversos meios de produção de lacase, a partir do fungo *Pycnoporus sanguineus*, foram utilizados com o objetivo de buscar alternativas mais econômicas para a produção da enzima. Entretanto o extrato enzimático utilizado para confecção dos biossensores

foi obtido através da biossíntese de lacases em meio líquido, contendo como substrato: extrato de malte e, como indutores: sulfato de cobre II e 2,5-xilidina (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Meios de biossíntese de lacases a partir do fungo *Pycnoporus sanguineus*. Número de inóculos contendo micélios, aplicados em cada frasco: seis.

Temperatura de 28°C, 150rpm e ausência de luz.	Temperatura ambiente, estático e ausência de luz.			
2,5-xilidina (200 mgL ⁻¹) + sulfato de cobre II (1 a 8.10 ⁻⁴ molL ⁻¹) + extrato de malte (1,25%(p/v))	L-dopa (100mgL ⁻¹) + extrato de malte [1,25%(p/v)]	Acafrão (0,25g/50mL) + glicose (1g/50mL) + caldo de batata (q.s.p. 50mL)	Casca de banana (20 pedaços de 0,5cm ² para 200mL de água) + sulfato de cobre II (4,0 x.10 ⁻⁵ molL ⁻¹)	Casca de banana (20 pedaços de 0,5cm ² para 200mL de água)

3.3.5 Atividade das Lacases

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados em relação ao tempo de supressão das medidas de absorbância observadas tanto para solução 1,0 x 10⁻³ molL⁻¹ seringaldazina (substrato ideal), quanto para soluções 1,0.10⁻³ molL⁻¹ de catecol e resorcinol, na presença de diferentes eletrólitos e em diferentes condições de pH.

Fez-se a leitura da absorbância, utilizando espectrofotômetro UV-visível, das reações de oxidação dos substratos (seringaldazina, catecol e resorcinol) catalisadas por extratos brutos de lacases. As reações de oxidação da seringaldazina foram efetuadas em tampão acetato (pH 5,0), em 525nm. As reações de oxidação do catecol foram feitas na faixa de pH de 2,0 a 8,0 em 420nm utilizando os eletrólitos na seguinte ordem: pH 2,0, KCl/HCl; pH 3,0 a 4,0, hidrogeno biftalato de potássio/HCl; pH 4,1 a 5,9, hidrogeno biftalato de potássio/NaOH; pH 6,0 a 8,0 NaH₂PO₄/NaOH; pH (3,0 a 8,0), acetato de potássio. Extratos brutos de lacases, após filtração a vácuo, foram guardados sob refrigeração à temperatura de 0°C por um período de até seis meses, e mantiveram atividade suficiente para elaboração de biossensores.

3.4 DESENVOLVIMENTO DOS BIOSSENSORES

Os biossensores foram preparados através da Trituração de grafite e em seguida a adição de alíquotas de extrato bruto de lacase, albumina sérica bovina (BSA) e glutaraldeído nas proporções indicadas na Tabela 3.3 durante 15 minutos em almofariz. Finalmente, acrescentou-se óleo mineral e, homogeneizou-se por mais 15 minutos para formar uma pasta. Foram utilizadas porções adequadas da pasta para preencher cavidade de 2,0 mm de diâmetro por 0,5 mm de profundidade nos eletrodos suportes (eletrodo de trabalho). O sistema amperométrico para determinação de compostos fenólicos em amostras ambientais foi montado conforme Figura 3.1. Os eletrodos de referência e auxiliar utilizados foram respectivamente Ag/AgCl e prata.

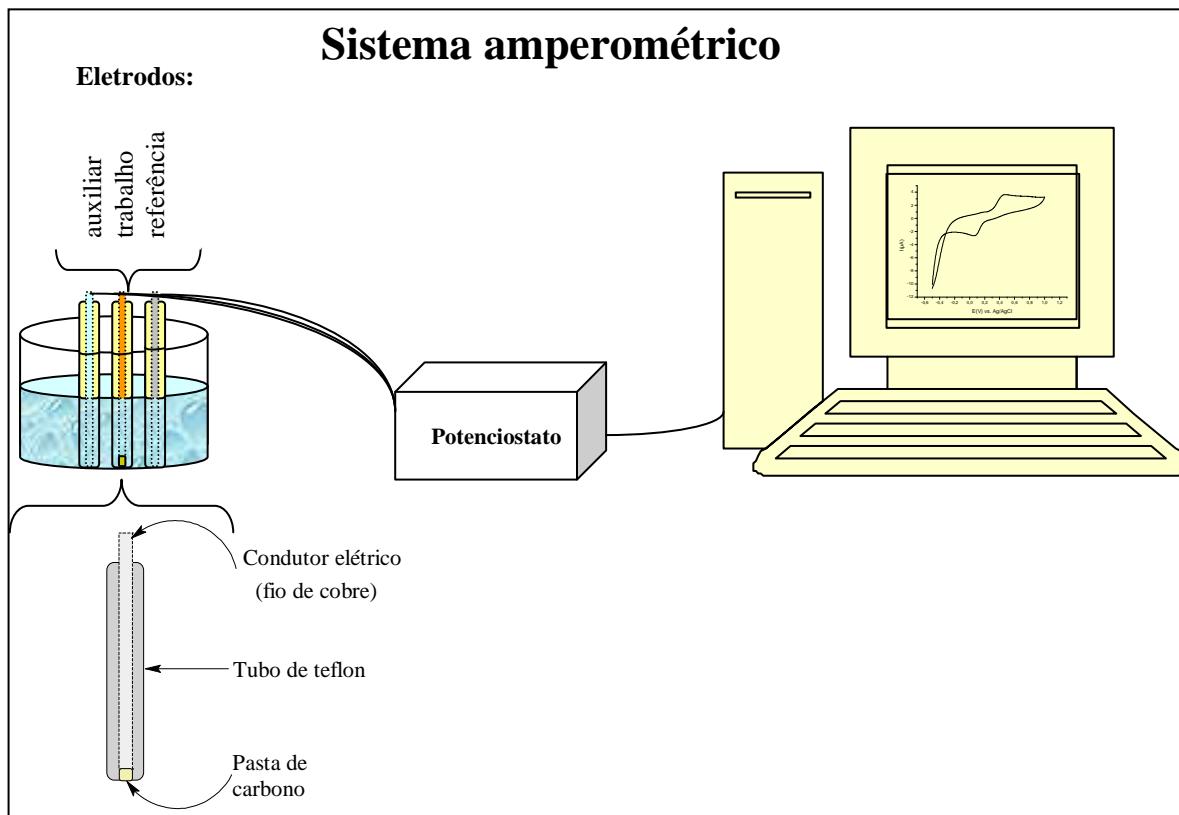


Figura 3.1. Sistema amperométrico para determinação de compostos fenólicos.

3.4.1 Estudo de Estabilidade e Resposta Relativa

Os biossensores obtidos com diferentes composições de pasta de carbono, inicialmente foram avaliados quanto à intensidade e tempo de resposta em relação ao catecol. Os melhores foram avaliados em relação ao tempo em que até 90% da atividade inicial se manteve.

3.4.2 Ensaios Eletroquímicos

Os parâmetros investigados na caracterização do biosensor incluíram: pH (3,0 - 8,0), aplicação de diferentes eletrólitos suportes e avaliação da resposta em águas residuárias, bem como parâmetros eletroquímicos específicos para técnicas de voltametria cíclica e de pulso diferencial. Os ensaios foram efetuados em temperatura e pressão ambiente.

Voltametria Cíclica

O comportamento do eletrodo na faixa de varredura de - 0,5 a 1,0 V foi avaliado através de sucessivos ciclos em tampão acetato (pH 5,0) 0,1 molL⁻¹ e tampão fosfato (pH 7,0) à velocidade de 10, 25, 50 e 100 mVs⁻¹. Sendo 100mVs⁻¹ a velocidade de melhor resposta, desta forma, foi utilizada para as determinações de CV.

Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)

Para ensaios de DPV, avaliou-se a resposta em velocidades de varredura de 15 a 150 mVs⁻¹ e variou-se a amplitude de pulso de 10 a 125 mV em relação ao catecol [300μmolL⁻¹] em tampão fosfato [0,1molL⁻¹] e pH 6,0.

Tabela 3.3 Composição dos eletrodos de pasta de carbono modificados com extrato bruto de Lacase (PCLs).

PCLs	Grafite em pó (mg)	Extrato bruto de lacase (2.5 U.mL ⁻¹) (μL)	Solução de BSA 0,2% (μL)	Glutaraldeído (μL)	Óleo mineral (mg)	Quitosana (mg)
PCL1	330	25.0	-	-	80	-
PCL2	330	50.0	-	-	80	-
PCL3	330	75.0	-	-	80	-
PCLbsa1	330	50.0	10.0	-	80	-
PCLbsa2	330	50.0	20.0	-	80	-
PCLbsag1	330	50.0	20.0	5.0	80	-
PCLbsag2	330	50.0	20.0	10.0	80	-
PCLbsag3	330	50.0	20.0	15.0	80	-
PCLq	330	50.0	-	-	80	40

PCL: pasta de carbono lacase

PCLbsa: pasta de carbono lacase albumina sérica bovina

PCLbsag: pasta de carbono lacase albumina sérica bovina glutaraldeído

PCLq: pasta de carbono lacase quitosana

Estudos da influência do pH e eletrólitos suporte

Catecol de concentração $5,0 \times 10^{-5}$ molL⁻¹ foi analisado, por DPV, em diferentes pHs (3,0 - 8,0) de tampão fosfato e acetato. As condições foram: biossensor de pasta de carbono contendo 1,5 UmL⁻¹ de enzima.mg⁻¹ de pasta, numa velocidade de varredura de 30 mVs⁻¹, faixa de potencial de 0,4 a 0,0 V e potencial de pulso de 50mV.

A resposta da enzima foi avaliada também nos eletrólitos, [0,1 molL⁻¹] em pH 5,0, formados por sais de potássio (acetato, biftalato, cloreto, nitrato e sulfato), sais de sódio (cloreto e sulfato) e os sais (cloreto de lítio e de potássio).

Para avaliar o efeito da concentração iônica foram utilizadas soluções de NaCl, cujas concentrações foram: 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 e 0,5 molL⁻¹, todas em pH 5,0.

3.4.3 Estudo da Resposta e Aplicação do Biossensor

Soluções 0,1 molL⁻¹ dos compostos fenólicos: catecol, hidroquinona, resorcinol, piragolol, fenol, acetaminofeno, 4-aminofenol, 2-cloro-fenol, 4-cloro-2-metil-fenol e 4-nitro-fenol foram analisadas por DPV utilizando biossensor em tampão fosfato 0,1 molL⁻¹ pH 7,0 com potencial de varredura de +0,4 a -0,4 V, velocidade de varredura de 30 mVs⁻¹ e amplitude de pulso de 50 mV. Os percentuais de respostas foram dados em função dos níveis de pico de corrente catódica (Ipc), observados.

Curvas de calibração dos compostos fenólicos foram construídas a partir de concentrações 0,1 molL⁻¹ para concentrações finais na faixa de 10^{-3} a 10^{-5} molL⁻¹ em tampão fosfato 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. Os ensaios foram efetuados em célula eletroquímica por DPV numa velocidade de varredura de 30mVs⁻¹, amplitude de pulso de 50mV e faixa de potencial de 0,4 a 0,0 V.

Utilizando o biossensor PCL2, foram efetuadas análises de águas residuárias de laboratórios de química da UFG, escolhidos de forma aleatória e sem conhecimento prévio de possíveis interferentes, com o objetivo de detectar a presença de substâncias eletroativas interferentes à detecção do catecol. As amostras foram coletadas e analisadas imediatamente após a coleta. As mesmas foram preparadas e analisadas como segue: em um balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se 25 mL da amostra e completou-se o volume com tampão fosfato 0,2 molL⁻¹ pH 7,0. À porções desta solução resultante, adicionou-se solução de catecol na célula eletroquímica nas proporções 1:4, 1:1 e 4:1 formando um volume final de 10mL. Efetuou-se a DPV numa velocidade de varredura de 30mVs⁻¹, faixa de potencial de 0,4 a 0,0 V e potencial de pulso de 50mV. As respostas foram dadas em função dos níveis de pico de corrente catódica (Ipc).

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 PRODUÇÃO DE LACASES E ENSAIOS DE ATIVIDADE EM SOLUÇÃO

O cultivo e reprodução dos fungos *Pycnoporus sanguineus*, nos meios e condições utilizados, ocorreu livre de contaminação e com boa taxa de crescimento. A Figura 4.1 mostra uma placa com colônias do fungo formadas no meio de cultura indicado na secção 3.3.1.



Figura 4.1. Cultura do fungo *Pycnoporus sanguineus*

O fungo *Pycnoporus sanguineus* que, desenvolveu-se no meio de produção de lacase (extrato de malte + sulfato de cobre II ($4,0 \times 10^{-5}$ molL $^{-1}$), 150rpm e ausência de luz) (GARCIA et al., 2006) encontra-se representado na Figura 4.2.

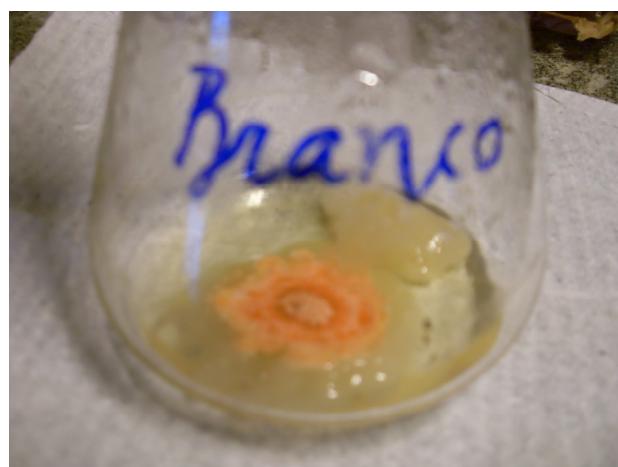


Figura 4.2. Fungo, *Pycnoporus sanguineus*, formado na biossíntese de lacase nas condições: meio de cultura contendo extrato de malte (1,25%(p/v)), sulfato de cobre II ($4,0 \times 10^{-5}$ molL $^{-1}$); 150rpm, 28°C e ausência de luz.

Os meios de produção de lacase contendo como substrato casca de banana (Figura 4.3), açafrão, L-dopa e concentração de íons cobre ($\geq 10^{-5}$ molL $^{-1}$), apresentaram baixos valores de atividade ($\approx 2,5$ UL $^{-1}$) comparados com aqueles contendo elevadas concentrações de íons cobre (10 $^{-4}$ molL $^{-1}$) que apresentaram elevada atividade (≈ 3000 UL $^{-1}$). Portanto, extratos brutos com baixa atividade não foram viáveis para confecção de biossensores, sendo apenas úteis para estudos de atividade em solução.



Figura 4.3. Biossíntese de lacases contendo, como substrato, casca de banana.

Os extratos brutos, utilizados para ensaios de atividade em solução e para elaboração dos biossensores, foram coletados no pico de atividade. Os valores de atividades de lacases biossintetizadas em meio contendo casca de banana e sulfato de cobre II (com/sem) encontram-se na Figura 4.4 e calculados conforme Leite e colaboradores (2008).

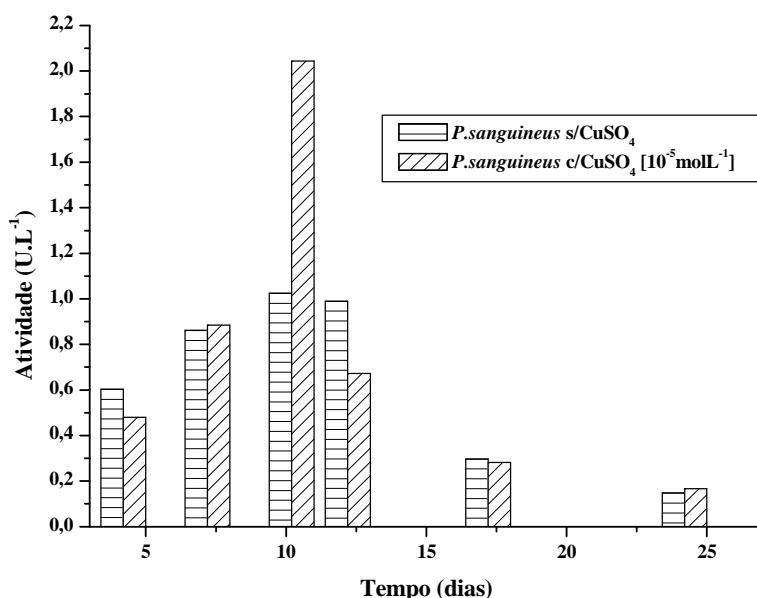


Figura 4.4. Evolução da atividade, na oxidação da seringaldazina, durante a biossíntese de lacases do fungo *Pynoporus sanguineus*. Meio: casca de banana.

Valores de até 4100 $U.L^{-1}$ foram obtidos para a biossíntese de lacase com concentrações de íons cobre de $8,0 \times 10^{-4} mol.L^{-1}$, presentes no meio de cultura. Portanto, para confecção de biossensores, é importante uma atividade para lacases em torno de $2500 U.L^{-1}$. Com valores altos de atividade de lacases temos as reações de oxidação dos compostos fenólicos com catálise enzimática rápidas, melhorando as respostas eletroquímicas nos biossensores.

Explica-se o uso de cobre, sulfato de cobre II, como indutor na produção de lacases, pois faz parte da composição das mesmas na integração do centro ativo. Verificou-se que um aumento na concentração do sulfato II, no meio de biossíntese de lacases, aumentou a atividade do extrato bruto (Tabela 4.1). Em meios alternativos de produção de lacases, por exemplo: casca de banana, além da baixa concentração de íons cobre presentes no meio, pode ter ocorrido co-produção de quinases, as quais comprometem a estabilidade de enzimas, diminuindo a meia vida destas.

Tabela 4.1 Biossíntese de lacases a partir do fungo *Pycnoporus sanguineus* em meio contendo: 2,5-xilidina ($200 mg.L^{-1}$), extrato de malte (1,25% p/v) e proporções variadas de sulfato de cobre II.

Sulfato de cobre II	Atividade ($U.L^{-1}$)
$1,0 \times 10^{-4} mol.L^{-1}$	2200
$4,0 \times 10^{-4} mol.L^{-1}$	3000
$8,0 \times 10^{-4} mol.L^{-1}$	4100

As atividades dos extratos brutos de lacases em solução em relação aos compostos fenólicos (catecol, resorcinol), foram feitas em diferentes eletrólitos e pHs variando de 3,0 a 8,0. Os resultados mostraram que, independendo do eletrólito utilizado, a maior atividade da enzima ocorreu na faixa de pH de 4,0 a 5,0 (Figura 4.5).

A Figura 4.6 mostra a atividade do extrato bruto das lacases no eletrólito cloreto de potássio, na faixa de pH de 3,0 a 8,0 em relação ao catecol. Conforme descrito por Garcia e colaboradores (2006), o fungo *Pycnoporus sanguineus* forma duas isoformas de lacases: Lac 1 e Lac 2. Na presença do eletrólito cloreto de potássio, há indício de que a isoforma de lacase que tem maior atividade em torno de pH 4,0, é mais inibida pelo haileto, do que a aquela que tem maior atividade em torno de pH 5,0.

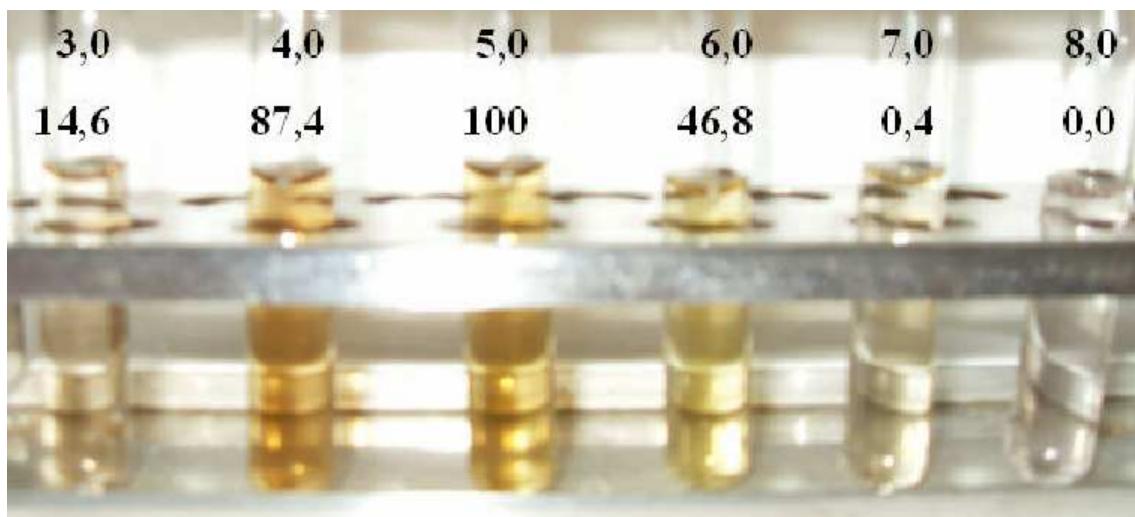


Figura 4.5. Reação de oxidação do catecol catalisada pela enzima lacase, em eletrólito acetato de potássio nos pHs 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 e atividades percentuais respectivas.

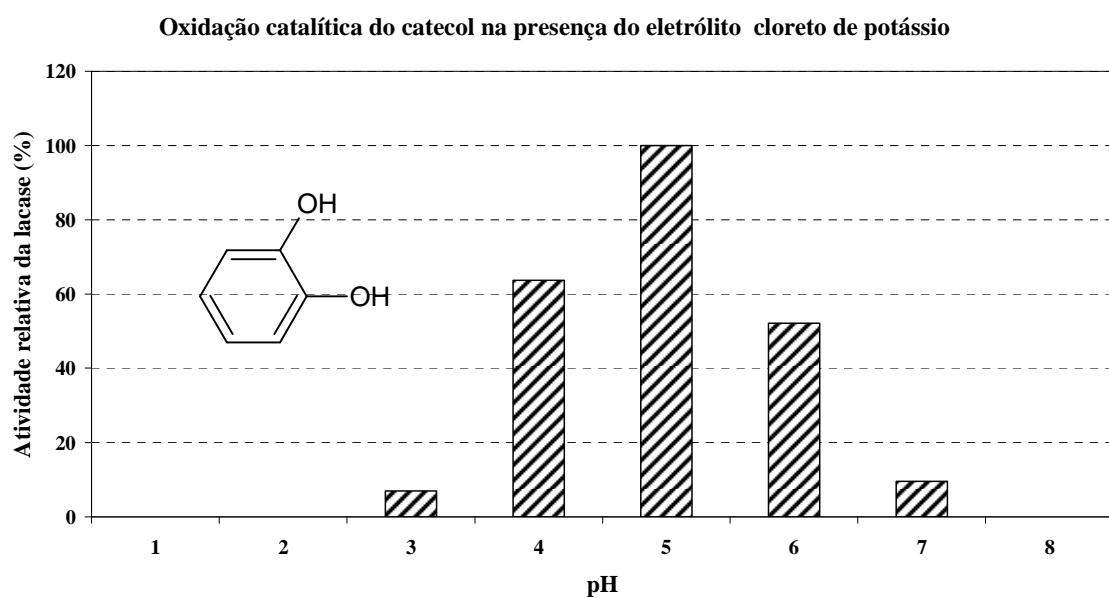


Figura 4.6. Oxidação catalítica do catecol, em diferentes pHs, na presença do eletrólito cloreto de potássio ($0,1 \text{ molL}^{-1}$).

Pode-se verificar que os eletrólitos acetato de sódio e fosfato de sódio são melhores, por exemplo, do que o cloreto de sódio (Figuras 4.7 e 4.8). Também estando de acordo com a literatura, a qual indica que os haletos são inibidores da atividade de lacases.

Oxidação catalítica do resorcinol à pH 5,0

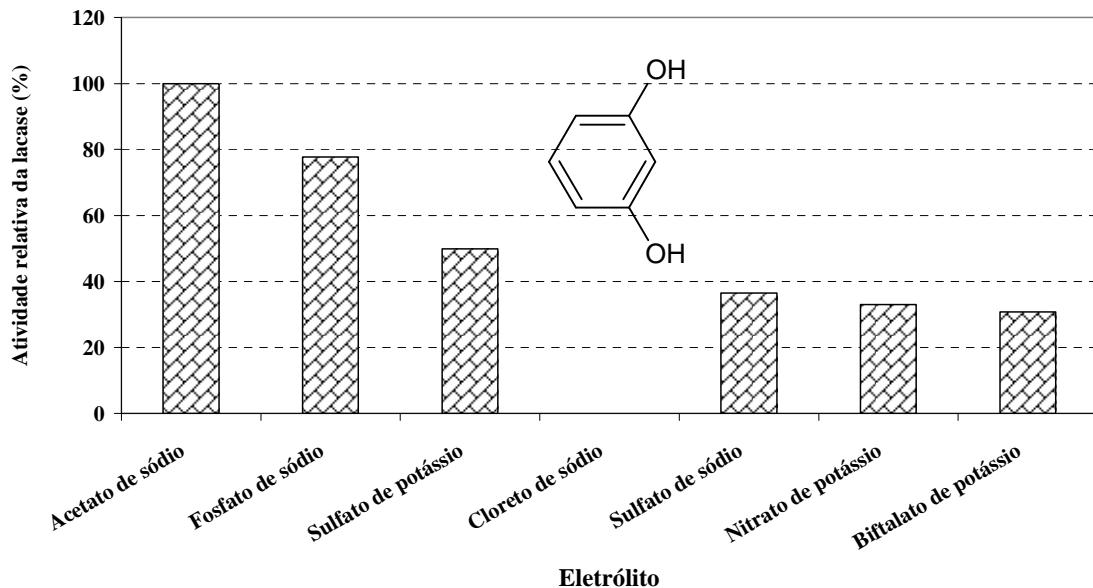


Figura 4.7. Reação de oxidação do **resorcinol** catalisada pela enzima lacase, em diferentes eletrólitos à pH 5,0. Tempo de reação: 180min. Concentração dos eletrólitos: $0,1 \text{ molL}^{-1}$.

Oxidação catalítica do catecol à pH 5,0

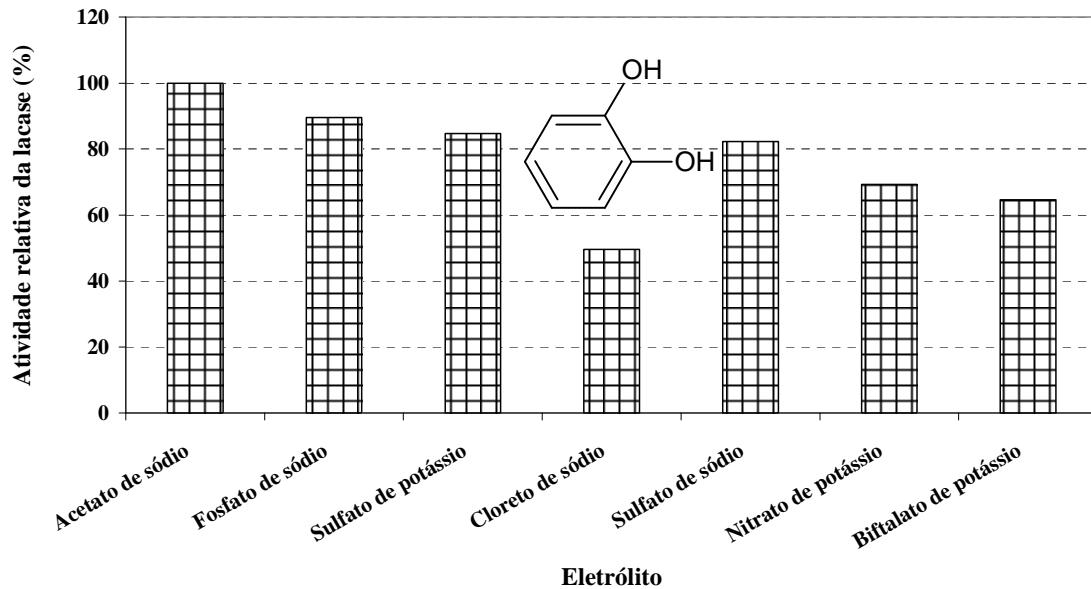


Figura 4.8. Reação de oxidação do **catecol**, catalisada pela enzima lacase, em diferentes eletrólitos à pH 5,0. Tempo de reação: 40min. Concentração dos eletrólitos: $0,1 \text{ molL}^{-1}$.

Observou-se também que o catecol tem sua reação de oxidação, catalisada pela lacase, mais rápida que o resorcinol, sendo que o tempo aproximado de reação necessário respectivamente de 40 e 180 minutos (Figuras 4.7 e 4.8). Este comportamento está de acordo com a literatura (MOROZOVA^a *et al.*, 2007), que aponta os *ortho*-fenóis (catecol) mais reativos do que os *meta*-fenóis (resorcinol).

Os biossensores foram confeccionados com extratos brutos de lacases de meios de cultura coletados no pico de atividade das lacases. Neste ponto tem-se uma maior concentração de lacase e, consequentemente, aumenta a eficiência da resposta dos biossensores elaborados. Elaborou-se biossensores com extrato bruto de lacases de baixa atividade ($2,5\text{ UL}^{-1}$), porém, as respostas obtidas não estão apresentadas neste trabalho. Optou-se pelo uso de lacase cuja biossíntese forneceu maior atividade (4100 U L^{-1}) (substrato: extrato de malte; indutores: 2,5-xilidina e sulfato de cobre II; agitação: 150rpm a 28^0C ; ausência de luz).

4.2 DESENVOLVIMENTO DOS BIOSSENSORES

O uso de lacases na confecção de biossensores tem sido bastante explorado, especialmente lacases com altos potenciais do T1 *versus* NHE. Entre as diversas técnicas de imobilização de enzimas, descritas na literatura, optou-se pelo uso de eletrodos de pasta de carbono devido à simplicidade de elaboração. Os parâmetros de desempenho para eletrodos modificados com pastas de carbono encontram-se na Tabela 4.2.

Observa-se na tabela 4.2 que desempenho superior foi alcançado na intensidade de resposta com o biossensor de eletrodo PCLbsag2. O biossensor formado pelo eletrodo PCL2 utilizou menor quantidade de materiais e, diferenças pouco significativas quanto ao desempenho, então, este foi utilizado nos estudos de aplicação e otimização dos demais parâmetros.

Tabela 4.2. Eficiência relativa de eletrodos modificados com pasta de carbono, testados com catecol.

PCLs	Atividade relativa (%)	Estabilidade (90% atividade inicial)	
PCL1	70		-
PCL2	99	65 dias	
PCL3	98	60 dias	
PCLbsa1	88	-	
PCLbsa2	90	55 dias	
PCLbsag1	100	65 dias	
PCLbsag2	98	-	
PCLbsag3	85	-	
PCLq	99	-	

PCL: Pasta de carbono lacase

PCLbsa: Pasta de carbono lacase albumina sérica bovina

PCLbsag: Pasta de carbono lacase albumina sérica bovina glutaraldeído

PCLq: Pasta de carbono lacase quitosana

A Tabela 4.3 mostra que os valores de maior atividade enzimática não estão na mesma faixa de pH do que aqueles encontrados, quando a atividade foi testada em solução, o desempenho da enzima imobilizada em função do pH mostrou-se mais eficiente na faixa de pH de 6,0 a 7,0. Apresentando, menores potenciais e maiores corrente de pico (Ipc).

Tabela 4.3. Dados de Epc e Ipc para redução da quinona formada a partir da oxidação enzimática do catecol em diferentes pHs.

pH	Tampão Fosfato		Tampão Acetato	
	Epc (mV)	Ipc (μA)	Epc (mV)	Ipc (μA)
3,0	295; 071	-0,087; -0,083	295	-0,205
4,0	235	-0,156	333*; 220	-0,404; -1,100
5,0	220	-0,300	295; 176	-0,092; -0,192
6,0	191	-0,591	235	-0,245
7,0	146	-0,597	161	-1,002
8,0	101	-0,513	146	-0,824

Epc: Potencial de pico catódico;

Ipc: Corrente de pico catódica;

* pico de baixa resolução (ombro).

A investigação do comportamento do biosensor PCL2 em diferentes eletrólitos foi realizada com o propósito de verificar se ânions coordenantes, como cloretos, interferem na atividade da enzima imobilizada. A inibição enzimática, apresentada devido à capacidade coordenante destes ânions, resulta em menor nível de corrente catódica em eletrólitos formados a partir destes ânions (Tabela 4.4). Observou-se também a força do eletrólito em relação aos cátions Li^+ , Na^+ e K^+ quando os mesmos apresentam como contra-íon o ânion cloreto, contatando-se a seguinte ordem crescente de inibição: (1) LiCl (2) NaCl (3) KCl . Os resultados, mostrados na Tabela 4.4, comprovam as propriedades dos metais alcalinos, as quais indicam que: quanto maior é o tamanho do átomo, maior será sua eletropositividade, neste caso, formando com o cloro que é bastante eletronegativo, um eletrólito muito forte e favorecendo a coordenação do mesmo com o íon cobre da lacase. Desta forma, não deixando o cobre tão disponível para agir como catalisador na reação de oxidação do catecol.

Tabela 4.4. Dados de Epc e Ipc para redução eletroquímica da quinona, formada através de catálise enzimática, em diferentes eletrólitos ($0,1 \text{ molL}^{-1}$, pH 5,0).

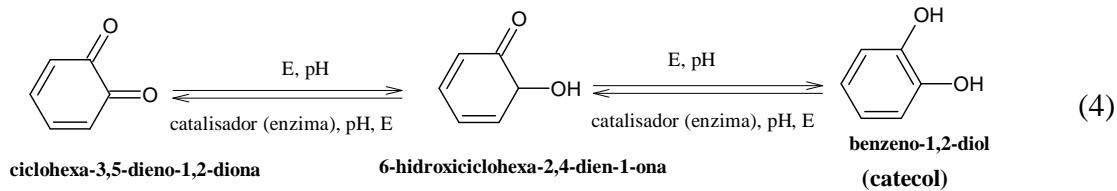
Eletrólito	Epc (mV)	Ipc (μA)
Biftalato de potássio	310; 146	-6,432; -6,541
Acetato de potássio	325; 176	-2,617; -1,728
Fosfato de potássio	310; 161	-2,573; -0,863
Sulfato de sódio	116	-2,589
Sulfato de potássio	101	-2,549
Cloreto de lítio	116	-1,833
Nitrato de potássio	116	-1,247
Cloreto de sódio	116	-0,707
Cloreto de potássio	101	-0,546

Epc: Potencial de pico catódico;

Ipc: Corrente de pico catódica;

Em condições adequadas de pH e eletrólito (por exemplo: biftalato pH 5,0) a lacase promove a oxidação do catecol à respectiva quinona com maior eficiência. Portanto, quando ocorre a redução eletroquímica da quinona ocorrem em DPV, maiores níveis de corrente. Entretanto, voltamogramas de pulso diferencial apresentaram em ensaios realizados com pH 5,0 e nos eletrólitos biftalato, fosfato e acetato, dois picos

catódicos (Figura 4.10). Este fato pode estar associado à redução eletroquímica da quinona formada, que ocorre em duas etapas, correspondentes às duas hidroxilas presentes no catecol. Propõe-se então a Equação 4 para justificar o aparecimento dos dois picos nos voltamogramas, bem evidenciados quando utilizamos DPV.



Dois picos (Ipa) foram observados tanto em técnicas menos sensíveis como a voltametria cíclica (Figura 4.9) como em voltametria de pulso diferencial (Figura 4.10), quando temos condições ideais de concentração enzimática, pH, eletrólito e ajustes adequados nos parâmetros de CV (acetato pH 5,0) e DPV (bifatalato pH 5,0) para uma boa atividade enzimática. Outro ponto fundamental observado são os valores de potencial de pico anódico (Epa) e Epc, que aparecem ambos em torno de 0,3V, indicando boa reversibilidade no processo redox do catecol, nas condições estudadas (Figura 4.9).

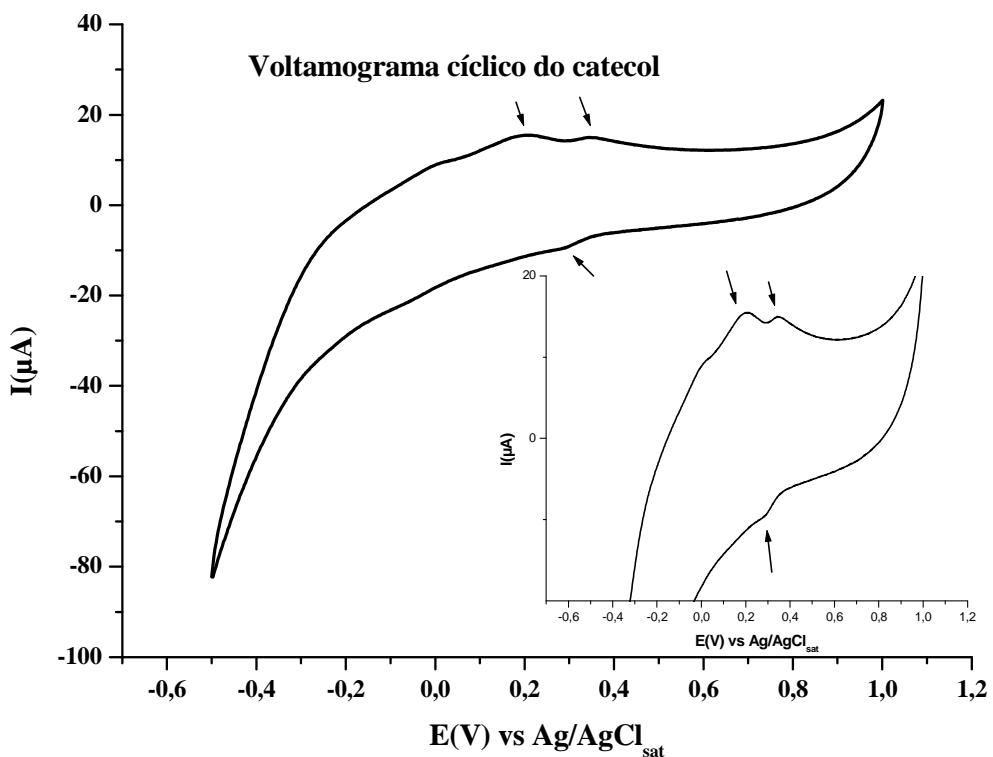


Figura 4.9. CV do catecol $[5.10^{-5} \text{ molL}^{-1}]$ em tampão acetato $[0,1\text{molL}^{-1}]$, pH 5,0. Velocidade de varredura: 100mVs^{-1} . Faixa de varredura: -0,5 a 1,0V. Eletrodo de trabalho:PCL2.

Nas condições onde ocorre maior inibição enzimática, atribuída neste caso ao ânion cloreto (cloreto de potássio), ocorre apenas um pico de redução (Figura 4.10). Nesta situação, possivelmente, ocorre oxidação enzimática parcial do catecol ou ainda a oxidação completa não sendo visualizada “em potenciais indistinguíveis”, sendo que os potenciais aplicados foram bastante negativos.

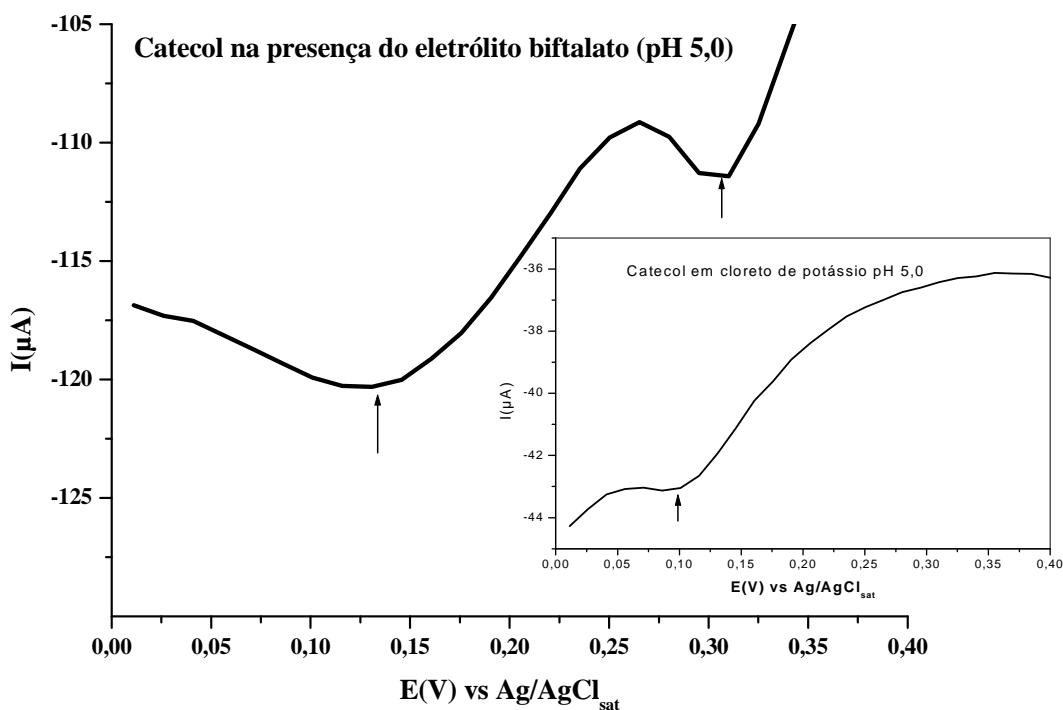


Figura 4.10. DPV de redução, da quinona a catecol, nos eletrólitos ($0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0) ; biftalato e cloreto de potássio. Faixa de varredura; 0,4 a 0,0V. Potencial de varredura: 30 mV.s^{-1} . Potencial de pulso: 50mV. Eletrodo de trabalho: PCL2.

No estudo com o eletrólito cloreto de sódio (Figura 4.11) observa-se que mesmo ocorrendo inibição da lacase pelo eletrólito contendo o ânion cloreto, em concentrações elevadas [$0,5\text{ mol L}^{-1}$], é possível detectar compostos fenólicos em amostras contendo este ânion na faixa de [$0,005$ a $0,05\text{ mol L}^{-1}$]. Recomenda-se a diluição da mesma para análise de compostos fenólicos com biossensor a base de lacase, no caso de amostras muito concentradas em eletrólito contendo o ânion cloreto. Por outro lado, em água potável, onde a quantidade de eletrólito é muito pequena, ocorre muita resistência da solução, dificultando a detecção de compostos fenólicos. Neste caso, recomenda-se a adição de um eletrólito à amostra em questão para aumentar a condutividade, para então efetuar a análise da mesma utilizando o biossensor.

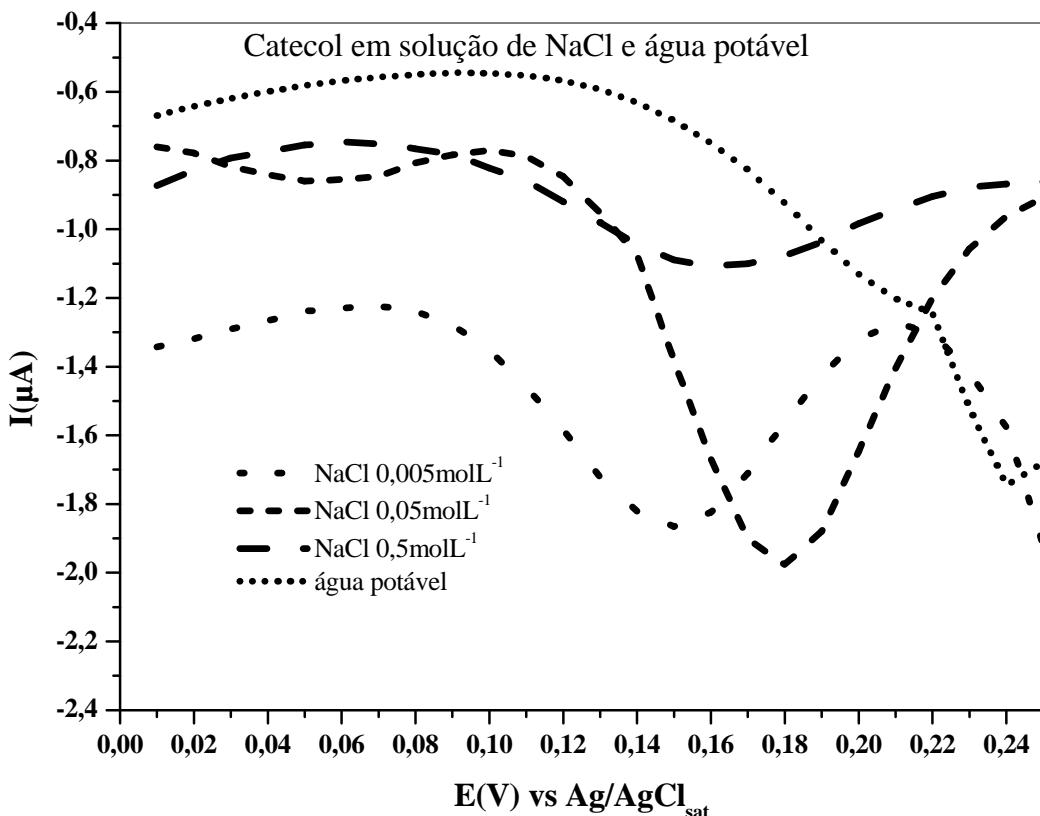


Figura 4.11. DPV do catecol $[5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}]$ em diferentes concentrações de cloreto de sódio (pH 5,0) e em água potável. Faixa de varredura: 0,4 a 0,0V. Potencial de pulso: 50mV. Velocidade de varredura: 30mVs^{-1} . Eletrodo de trabalho: PCL2.

A Figura 4.12 apresenta as atividades da lacase no eletrodo PCL2 em relação ao catecol, em tampão acetato, utilizando DPV. A atividade da lacase mostra-se maior nos pHs 7,0 (potencial de redução da quinona: 0,17V) e 8,0 (potencial de redução da quinona: 0,18V). Diferentemente dos valores apresentados com a enzima livre, cujas maiores atividades para enzima em tampão acetato ocorrem nos pHs 4,0 e 5,0. Nos pHs 4,0, 5,0 e 6,0 a enzima também mostra-se ativa apresentando menores valores para potenciais de redução da quinona (pH 4,0, $E = 0,13\text{V}$; pH 5,0, $E = 0,17\text{V}$; pH 6,0, $E = 0,13\text{V}$). No entanto, os melhores picos de redução da quinona a catecol aparecem nos pHs 7,0 e 8,0.

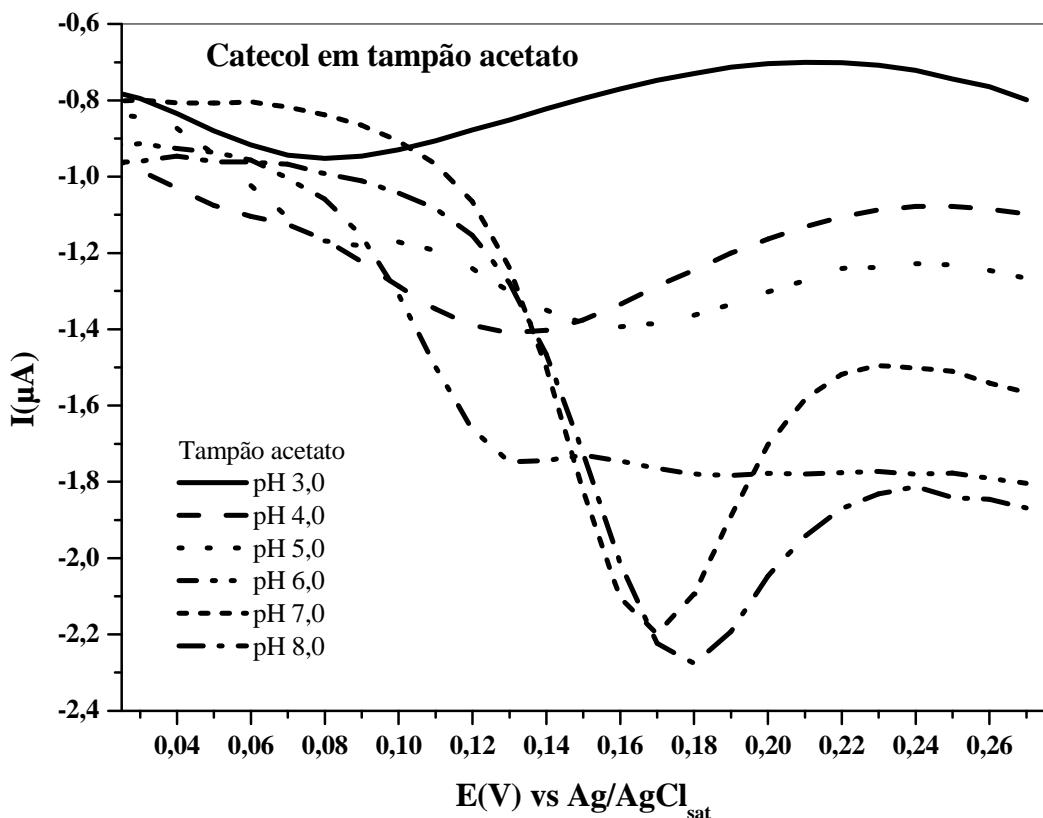


Figura 4.12. DPV do catecol $[5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}]$ em eletrólito acetato de potássio $(0,1 \text{ mol L}^{-1})$. Eletrodo de trabalho: PCL2. Velocidade de varredura: 30 mV s^{-1} . Faixa de varredura: 0,4 a 0,0V. Potencial de pulso: 50mV. Velocidade de varredura: 30 mV s^{-1} .

A Figura 4.13 mostra a influência do pH na atividade da lacase, sendo que a atividade da enzima, em tampão fosfato, é melhor em pH 5,0. Portanto, a redução eletroquímica da quinona ocorre num potencial em torno de 0,09V, ou seja, num potencial bem próximo de zero, indicando fortemente a influência do pH na oxidação do catecol e, consequentemente na redução eletroquímica da quinona ao catecol.

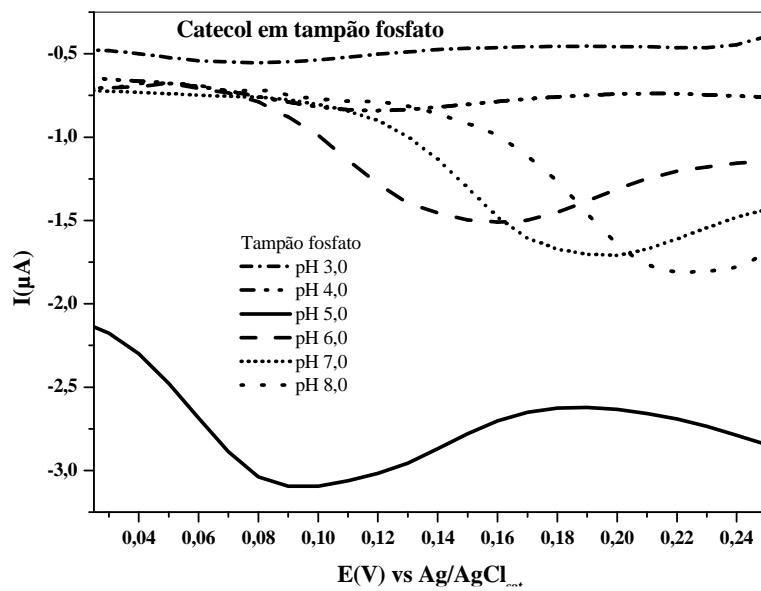


Figura 4.13. DPV do catecol $[5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}]$ em diferentes pHs do eletrólito fosfato $(0,1 \text{ mol L}^{-1})$. Eletrodo de trabalho: PCL2. Faixa de varredura: 0,4 a 0,0V. Potencial de pulso: 50mV. Velocidade de varredura: 30 mVs^{-1} .

Os gráficos de DPV mostram diferenças pouco significativas entre as pastas PCL2, PCLbsag, optando-se pelo uso da pasta de composição mais simples (Figura 4.14).

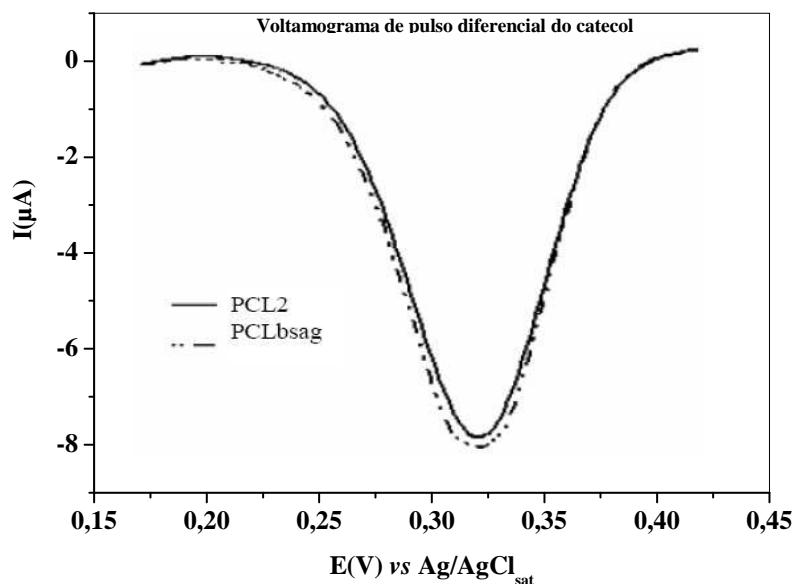


Figura 4.14. Voltamogramas de Pulso Diferencial do catecol. Tampão fostato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0; Faixa de varredura: 0,4 a 0,0V; Velocidade de varredura: 30 mVs^{-1} ; Potencial de pulso: 50 mV.

Quando as enzimas são utilizadas nos biossensores temos como expectativas a diminuição do potencial eletroquímico aplicado necessário, diminuição da variação de potencial de pico (ΔE_p) e aumento dos níveis de corrente observados. Os voltamogramas cíclicos obtidos na faixa de -0,5 a 1,0 V para eletrodos de pasta de carbono (PC), PCL2 e PCLq são apresentados na Figura 4.15.

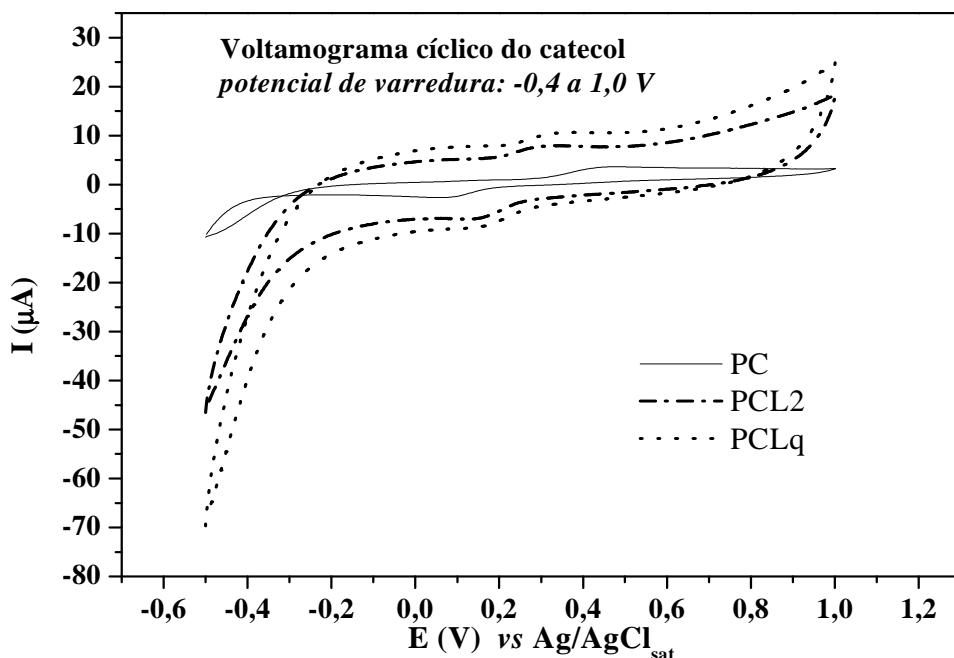


Figura 4.15. Voltamogramas cíclicos do catecol $[5,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}]$. Condições: tampão fosfato $0,1 \text{ molL}^{-1}$ (pH 7.0); faixa de varredura: -0,4 a 1,0 V; velocidade de varredura: 100 mVs^{-1} .

Entretanto, o ganho em reversibilidade do processo redox evidenciado pela redução dos valores de ΔE_p , bem como a maior facilidade de transferência de elétrons evidenciada pelos potenciais menos positivos e negativos, respectivamente para oxidação e redução, necessários ao rompimento da barreira de energia, estão mais associados a mudanças da superfície do eletrodo favorecida pela adição de biopolímeros (proteínas e/ou quitosana) com boas propriedades condutoras, que efetivamente a co-participação enzimática. Por outro lado, o aumento dos níveis de corrente, quando considerado a somatória da contribuição capacitiva e eventualmente de outras espécies eletroativas presentes no extrato bruto não são tão expressivos.

A estratégia ou princípio analítico aqui empregado envolve a oxidação bioquímica na superfície da pasta, sendo esta, proporcional a concentração de fenóis, seguida por sua detecção eletroquímica a partir dos valores de picos catódicos observados no processo de retorno (redução da quinona oxidada enzimaticamente). Nos estudos de voltametria cíclica, o biossensor apresentou melhor desempenho na faixa de 0,2 a 0,4 V e boa estabilidade quando submetido à voltametria cíclica após 20 ciclos, indicando assim, baixa corrente de fundo (Figura 4.16). Esta faixa é aplicável para análise da maioria dos compostos fenólicos de interesse comercial e ambiental, e mostra que nesta faixa não há oxidação eletroquímica do catecol, evidenciando que ensaios de redução por DPV estão associados exclusivamente a quinona formada enzimaticamente.

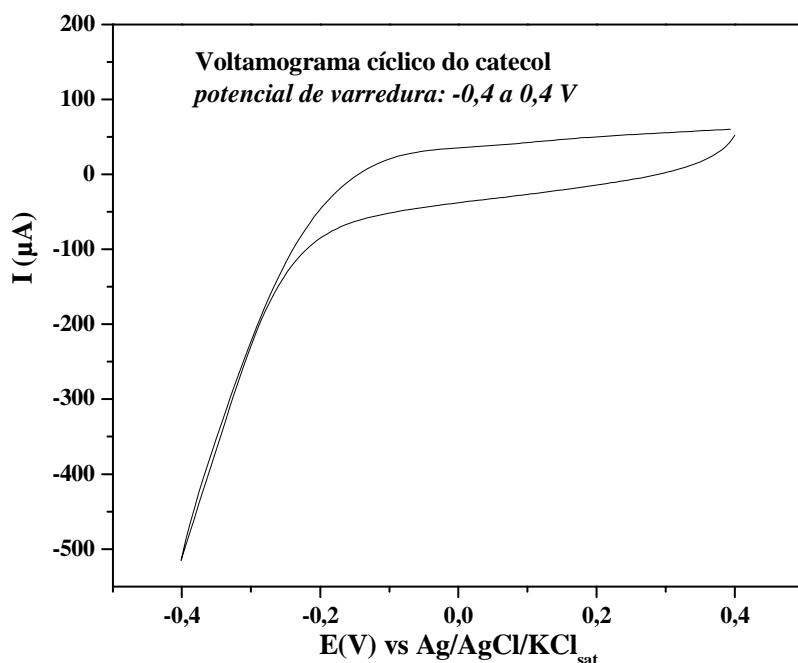


Figura 4.16. Voltamograma cíclico do catecol, utilizando o eletrodo suporte PCL2 nas condições: tampão fosfato 0,1 molL⁻¹ (pH 7.0); faixa de varredura: -0,4 a 0,4 V; velocidade de varredura: 100 mVs⁻¹.

Utilizou-se o catecol como substrato para comprovar a eficiência da enzima immobilizada no eletrodo de pasta de carbono. Voltamogramas de pulso diferencial, realizados nas mesmas condições, foram efetuados com eletrodo de pasta de carbono não enzimático. A Figura 4.17 mostra as diferenças expressivas para os níveis de corrente observados, correspondentes à redução da quinona, formada enzimaticamente e não enzimaticamente.

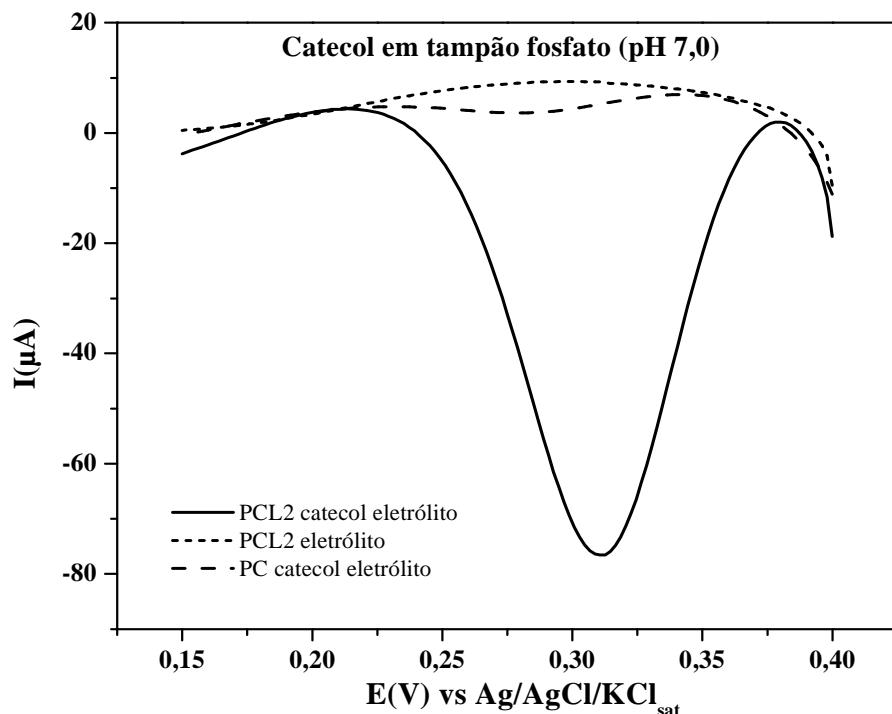


Figura 4.17. Voltamogramas de Pulso Diferencial do catecol $[3,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}]$. Tampão fostato $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0. Faixa de varredura: 0,4 a 0,0V. Velocidade de varredura: 30 mVs^{-1} . Potencial de pulso: 50 mV.

Testou-se o biossensor PCL2 com vários compostos fenólicos (Figura 4.18), apresentando melhor atividade para catecol e na sequência a hidroquinona e, baixa atividade para acetaminofeno e aminofenol e atividade praticamente nula para 2-clorofenol, 4-cloro-2-metil-fenol e nitro-fenol. As respostas apresentadas justificam o comportamento de grupamentos ou elementos que exercem fortes efeitos de estabilização por ressonância no anel benzênico, tais como, -OH e -NH₂, (exemplos: catecol, hidroquinona, pirogalol, fenol, 4-aminofenol), os quais, favorecem as reações

catalisadas por lacases e, grupamentos que desestabilizam o anel benzênico, tais como, $-\text{NO}_2$, $-\text{COOH}$ e halogênios (exemplos: 2-cloro-fenol, 4-cloro-2-metilfenol e 4-nitro-fenol), inibem o efeito catalítico das lacases.

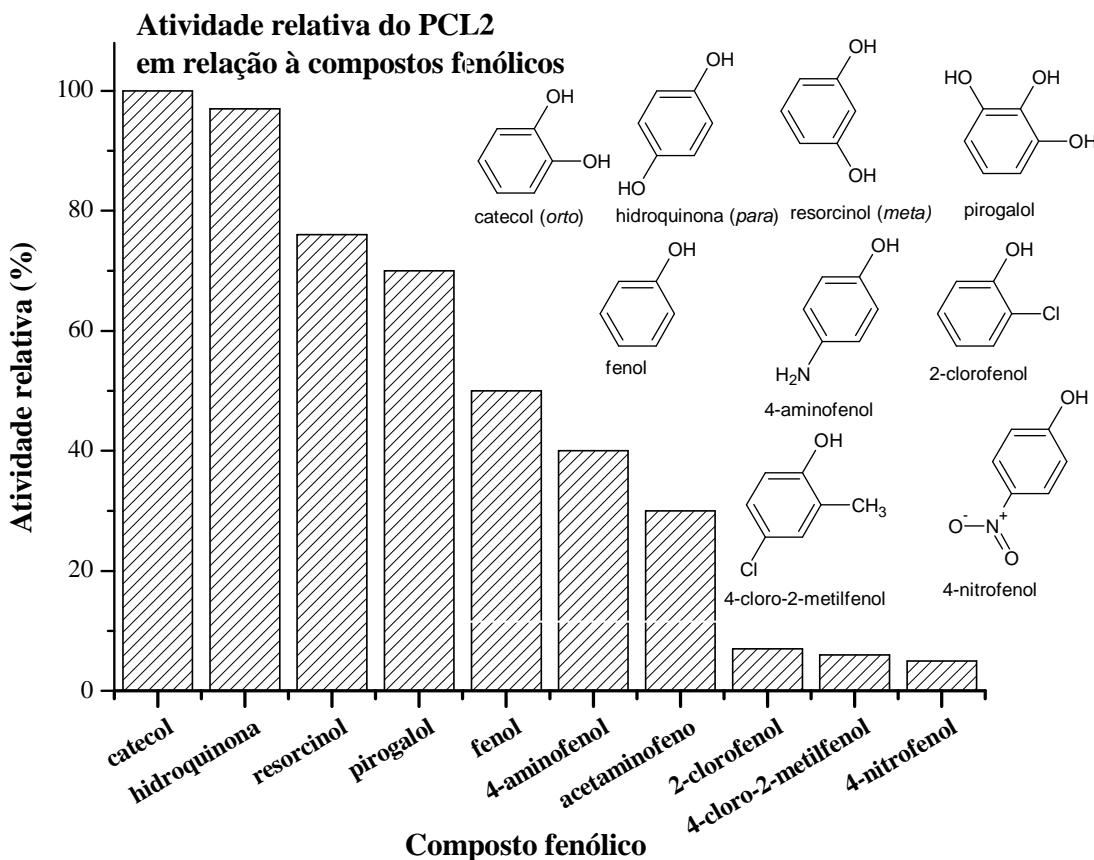


Figura 4.18. DPV - Atividades relativas (Ipc) apresentadas com a utilização de lacase do fungo *Pycnoporus sanguineus*, com o biosensor PCL2, para diferentes compostos fenólicos. Velocidade de varredura: 30 mVs^{-1} . Amplitude de pulso: 50mV. Potencial de varredura: +0,4 a -0,4 V. Tampão fosfato $0,1 \text{ molL}^{-1}$ (pH 7,0).

A Figura 4.19 apresenta as curvas de calibração, bem como voltamogramas de pulso diferencial obtidos, para diferentes concentrações de catecol em eletrólito fosfato ($0,1 \text{ molL}^{-1}$) pH 7,0. Nas condições deste estudo, observou-se uma correlação linear com $r = 0,99897$ na faixa de concentração de $2,0 \times 10^{-5}$ a $7,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$.

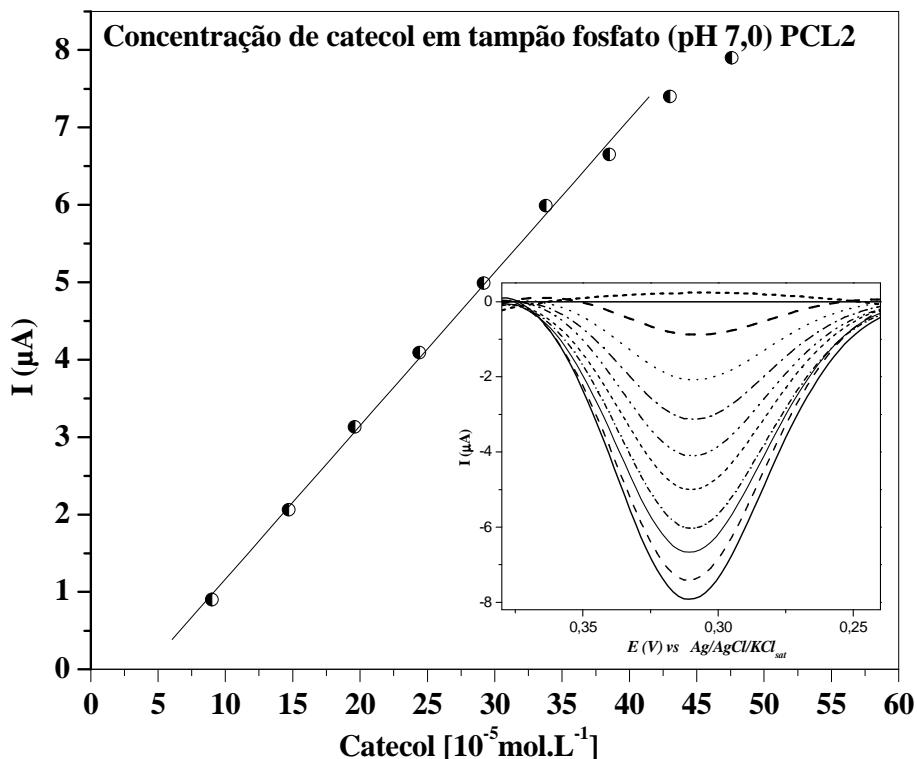


Figura 4.19. Curva de calibração e voltamogramas de pulso diferencial obtidos para diferentes concentrações de catecol em solução tampão fosfato $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0. Velocidade de varredura: 30mVs^{-1} . Potencial de pulso: 50mV. Eletrodo de trabalho: PCL2.

A Tabela 4.5 apresenta valores obtidos na determinação de percentual recuperado de catecol adicionado em águas residuárias de laboratórios de química da UFG. As amostras foram diluídas em tampão fosfato $0,2 \text{ molL}^{-1}$ na proporção 1:1 e concentrações finais conforme valores de volumes de solução de catecol $10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ adicionado. Para estas condições, foram obtidos valores de recuperação entre 97,5 a 101,0% do valor adicionado, indicando a ausência de interferência positiva ou negativa deste tipo de matriz. Os valores percentuais resultantes correspondem ao I_{pc} apresentados em DPV nas condições citadas.

Tabela 4.5. Estudo da adição e recuperação de catecol em águas residuárias de laboratórios de química da UFG utilizando DPV. Eletrodo de trabalho: PCL2.

Laboratório	amostra + eletrólito + catecol = 10mL		Recuperação do catecol	
	Volume (mL) de catecol (10^{-3} molL $^{-1}$) adicionado	Volume da amostra (mL) diluída 1:1 em tampão fosfato pH 7,0 (0,2 molL $^{-1}$)	Resposta proporcional à corrente (Ipc)	Resposta percentual
A	2,00	8,00	2,01	100,50
	5,00	5,00	5,03	100,60
	8,00	2,00	8,02	100,25
B	2,00	8,00	1,99	99,50
	5,00	5,00	4,98	99,60
	8,00	2,00	8,06	100,75
C	2,00	8,00	1,95	97,50
	5,00	5,00	5,05	101,00
	8,00	2,00	8,05	100,60
D	2,00	8,00	1,98	99,00
	5,00	5,00	4,98	99,60
	8,00	2,00	8,08	101,00

Parâmetros instrumentais de DPV, método escolhido por sua maior sensibilidade, foram também investigados, porém a capacidade do método de suprimir corrente capacitiva e evidenciar correntes faradaicas depende do ajuste ótimo do valor de pulso de potencial extra que é aplicado ao eletrodo em intervalos de tempo bem definidos.

Deste modo, o pulso aplicado (“Modulation Amplitude”) em medidas convencionais pode variar de 5 a 100 mV, sendo que quanto maior o pulso maior a sensibilidade, entretanto, pulsos altos podem comprometer a resolução do pico. Portanto, opta-se por valores intermediários 40 a 60 mV. Nos ensaios realizados, fixando-se a concentração de catecol, eletrólito suporte e utilizando o biossensor PCL2, verificou-se que acima de 50 mV, os picos de corrente não aumentam de forma tão expressiva, ocorrendo perda acentuada de resolução em potenciais de pulso acima de 75 mV (Figura 4.20).

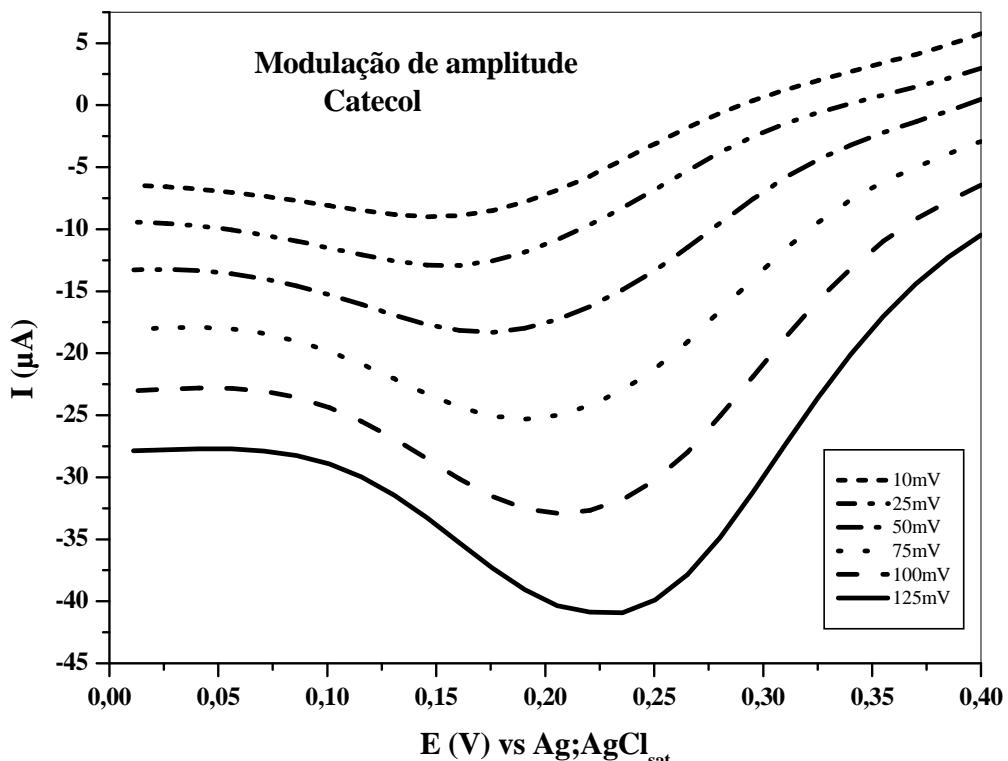


Figura 4.20. Modulação de Amplitude (“Modulation amplitude”). Catecol $[3,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}]$ em tampão fosfato ($0,1 \text{ molL}^{-1}$) pH 6,0. Eletrodo de trabalho: PCLq.

Outro parâmetro importante e de difícil ajuste em DPV é a velocidade de varredura (Figura 4.21), pois ao contrário da CV, em que ela é ajustada diretamente na DPV, nesta situação, depende de dois parâmetros: potencial de rampa (“Step Potential”) e intervalo de tempo em que cada pulso é aplicado (“Interval time”). Deste modo, já que a velocidade de varredura é o quociente destes dois parâmetros, várias combinações podem ser feitas a fim de se obter uma mesma velocidade, que podem comprometer não só o tempo de ensaio, mas principalmente, a resolução e sensibilidade do método.

Para velocidade de varredura de 30 mVs^{-1} o melhor desempenho foi obtido fixando-se o “Step Potential” em 15 mV e o “Interval time” em $0,5 \text{ s}$.

Os estudos de velocidade de varredura, mostram que nas condições de pH e eletrólito estudadas, temos um pico melhor na velocidade de 150 mVs^{-1} . No entanto, para cada pH e eletrólito, pode-se obter outra condição ótima de velocidade de varredura, como por exemplo o valor de 30 mVs^{-1} , que foi utilizada em diversas outras determinações e mostou-se com bons resultados para DPV.

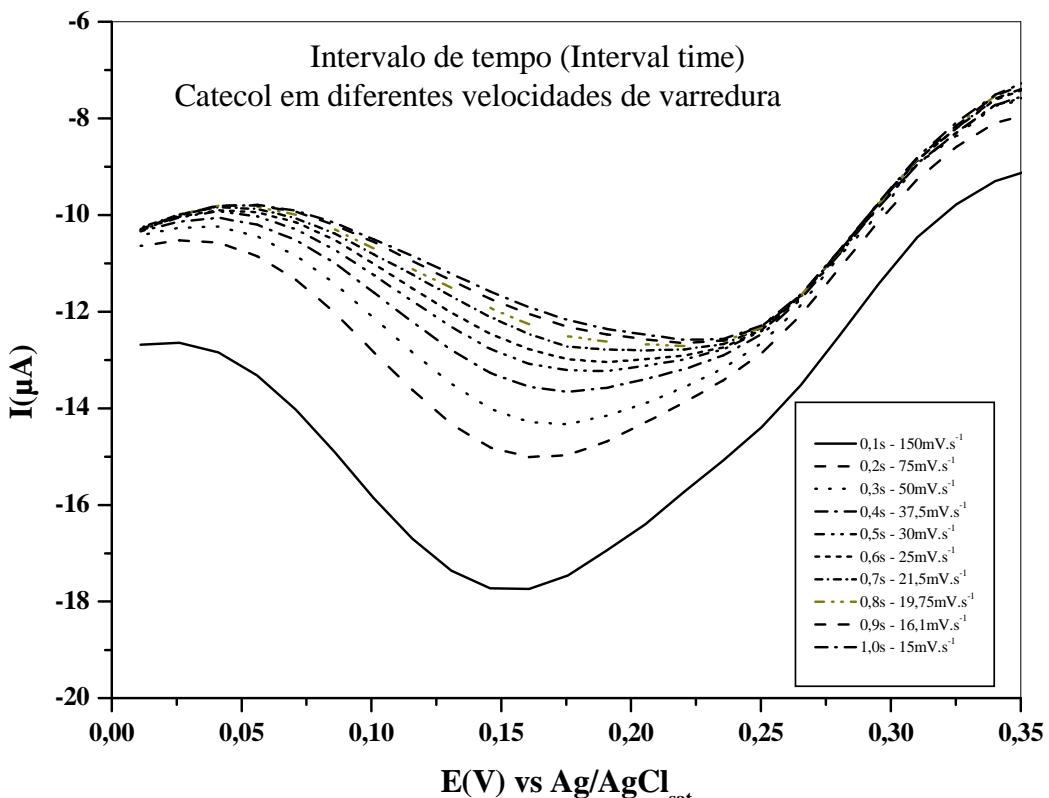


Figura 4.21. Intervalo de tempo. DPV do catecol $[3,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}]$ em eletrólito fosfato de sódio ($0,1 \text{ molL}^{-1}$, pH 6,0) aplicando-se diferentes velocidades de varredura. Faixa de varredura: 0,4 a 0,0V. Eletrodo de trabalho: PCLq.

A Tabela 4.6 apresenta valores ótimos em ensaios de DPV para o biosensor elaborado com o eletrodo PCL2.

Tabela 4.6. Parâmetros de otimização dos biosensores com eletrodos suporte PCL2 e PCLq, para soluções de catecol.

Parâmetro	Faixa estudada	Valor ótimo
Quantidade de enzima (U/mg de pasta)	0.25 – 2.00	1.50
Velocidade de varredura (mVs^{-1})	10 – 40	25-30
Amplitude de pulso (mV)	10 – 60	50
Faixa de varredura (V)	0.4 a -0.4	0.4 a 0.0
pH	3.0 – 8.0	7,0

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os biossensores formados, por extrato bruto de lacase do fungo *Pycnoporus sanguineus*, apresentaram bom desempenho na determinação de compostos fenólicos, especialmente quando, utilizou-se o extrato enzimático com elevada atividade.

São necessários ajustes nos parâmetros de DPV e CV quando as técnicas são utilizadas na determinação de compostos fenólicos, pois em condições ideais no ajuste, as curvas voltamétricas traduzem informações bastante precisas sobre concentrações de substratos e valores de Epc e Ipc.

Os estudos de biossíntese da enzima lacase indicaram que em meios de cultura contendo sais de cobre, a mesma tem um desenvolvimento bem acentuado, quando comparado com meios pobres em íons cobre. Em relação ao extrato bruto produzido nos meios de cultura contendo cobre, temos a lacase de alta atividade, condição necessária para um bom funcionamento do biossensor.

Estudos de condições de pH, eletrólitos, enzimático e eletroquímico, indicam valores ótimos de trabalho. No entanto, os estudos realizados mostraram que os compostos fenólicos podem ser detectados em várias condições de pH e eletrólitos. Desta forma, tornando viável, a detecção de compostos fenólicos em condições diversas de pH e eletrólitos. Mesmo nos eletrólitos contendo cloretos, onde há maior inibição enzimática, ainda é possível detectar compostos fenólicos. Desta maneira, a técnica de biossensores pode ser utilizada para detecção de compostos fenólicos em águas naturais e resíduárias de diversas ordens. Entretanto, para cada tipo de água, recomenda-se a otimização da técnica de biossensores a base de lacase.

Propostas de estudos futuros:

Estudos cinéticos:

Relação de atividade enzimática no UV-visível *versus* atividade de resposta eletroquímica utilizando CV e DPV. Estudar qual a relação existente entre a concentração enzimática e o Ipc do composto fenólico. Estudar uma possível equação de velocidade de reação da relação entre a concentração da enzima *versus* concentração do composto fenólico. Propor uma ordem para reação: zero, primeira ordem ou segunda ordem. Entretanto, a literatura aponta a enzima apenas como um catalisador.

Estudos da variação de temperatura:

Aplicação do biossensor de lacase de *Pycnoporus sanguineus* em diferentes

temperaturas de amostras de compostos fenólicos.

Estudos de inibidores enzimáticos:

Outros eletrólicos e/ou interferentes, além dos estudados, para catálise enzimática de compostos fenólicos.

Estudos de mediadores:

Aplicação de mediadores nos biossensores de lacase de *Pycnoporus sanguineus*.

Estudos de biossíntese de lacases:

Meios alternativos, economicamente favoráveis e ambientalmente corretos na produção de lacase, levando-se em consideração que o cobre é essencial à formação da mesma.

Estudos de parâmetros eletroquímicos:

Otimizar a aplicação das diversas técnicas eletroquímicas no estudo de compostos fenólicos em amostras ambientais.

Estudos de compostos fenólicos:

Fontes de compostos fenólicos, origem natural ou antropogênica, no meio ambiente em relação à sua disponibilidade em águas naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, J.; AHMAD, M; HENG, L. Y.; KARUPPIAH, N. e SIDEK, H. **An Optical Biosensor based on Immobilization of Laccase and MBTH in Stacked Films for the Detection of Catechol.** Sensors, 2007, 7, 2238-2250.
- ALLAN, I. J.; VRANA, B.; GREENWOOD, R.; MILLS, G.; ROIG, B. e GONZALEZ, C. **A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive.** Talanta, 2006, 69, 302–322.
- ALVES, M. V. S.; COSTA, A. F.; ESPIG, D. S. e VALE, A. T. **Ciência Florestal**, 2006, v. 16, n. 1, p. 17-26.
- BAKKER, E. e QIN, Y. **Electrochemical Sensors.** Anal. Chem., 2006, 78, 3965.
- BANCI, L.; CIOFI-BAFFONI, S. e TIEN, M. **Lignin and Mn Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Phenolic Lignin Oligomers.** Biochemistry, 1999, 38, 3205-3210.
- BARDELETTI, G.; SECHAUD, F. e COULET, P. C. **Amperometric enzyme electrodes for substrate and enzyme activity determinations.** In: BLUM, LOIC J. e COULET, PIERRE R. **Biosensor Principles and Applications.** Editora CRC, 1991.
- BLUM, LOIC J. e COULET, PIERRE R. **Biosensor Principles and Applications.** Editora CRC, 1991.
- BUGG, T. **An introduction to enzyme and coenzyme chemistry.** Editora: Blackwell Science, 1997.
- CAHN, M. T. **Biosensors.** Editora Chapman & Hall, 1994.
- CATTRALL, R. W. **Chemical sensors.** Oxford Science Publications. 1997.
- CHAILAPAKUL, O; NGAMUKOT, P.; YOOSAMRAN, A.; SIANGPROH, W.; WANGFUENGKANAGUL, N. **Recent electrochemical and optical sensors in flow-based analysis.** *Sens. Actuators B.*, 2006, v. 6, p. 1383-1410.

CHRISTENSON, A; SHLEEV, S; MANO, N.; HELLER, A. e GORTON, L. **Redox potentials of the blue copper sites of bilirubin oxidases.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1757, 1634–1641.

CORDI, L; MINUSSI, R.C.; FREIRE, R. S. e DURÁN, N. **Fungal laccase: copper induction, semi-purification, immobilization, phenolic effluent treatment and electrochemical measurement.** *African Journal of Biotechnology*, 2007, Vol. 6 (10), pp. 1255-1259.

DAVIS, F. e HIGSON, S. P. J. **Structured thin films as functional components within biosensors.** *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 21, 1–20.

Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. The European Parliament and Council, L327/1, 2000, p. 72.

DORF, Richard C. **The electrical engineering handbook: sensors, nanoscience, biomedical engineering and instruments.** Editora CRC, 2006.

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

FERNANDES, J. C. B. e KUBOTA, L. T. **Eletrodos íon-seletivos: histórico, mecanismo de resposta, seletividade e revisão de conceitos.** *Quim. Nova*, 2001, v. 24, n. 1, p. 120-130.

FREIRE, R.; DURAN, N. e KUBOTA, L. **Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds.** *T. Talanta*, 2001, 54, 681.

GALHAUP, C. e HALTRICH, D. **Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper.** *Applied Microbial Biotechnology*, 2001, 56: 225 – 232.

GARCIA, T. A.; ULHOA, C. J. e SANTIAGO, M. F. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus*.** Tese. Instituto de Ciências Biológicas. UNB., 2006.

GIANFREDA, L.; XU, F. e BOLLAG, J. M. **Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes.** Bioremediation J., 1999, 3, 1-26.

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

GOMES, S. A. S. S.; NOGUEIRA, J. M. F. e REBELO, M. J. F. **An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine.** Biosensors and Bioelectronics, 2004, 20, 1211-1216.

IUPAC. **Compendium of chemical terminology.** International Union of Pure and Applied Chemistry 2nd Edition, 1997, (1992), Research Triangle Park, NC, USA.

JIANG, D-S; LONG, S-Y; HUANG, J.; XIAO, H-Y e ZHOU, J-Y. **Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres.** Biochemical Engineering Journal, 2005, 25, 15-23.

KIISKINEN, L-L. **VTT Biotechnology. Characterization and heterologous production of a novel laccase from *Melanocarpus albomyces*.** Dissertation for the degree of Doctor of Science in Technology to be presented with due permission of the Department of Chemical Technology. Helsinki University of Technology (Espoo, Finland), 2005.

KISSINGER, P. T. **Biosensors—a perspective.** Biosensors and Bioelectronics, 2005, 20, 2512-2516.

KISSINGER, P. T. **Introduction to amperometric biosensor configurations.** Purdue University and Bioanalytical Systems, Inc., 1997.

KULYS, J. e VIDZIUNAITE, R. **Amperometric biosensors based on recombinant laccases for phenols determination.** Institute of biochemistry. Mokslininku 12, 2600 Vilnius, Lithuania. Biosensors and Bioelectronics, 2003, 18, 319-325.

LEITE, O. D.; FATIBELL-FILHO, O. e BARBOSA, A. M. **Determination of catecholamines in pharmaceutical formulations using a biosensor modified with a crude extract of fungi laccase (*Pleurotus ostreatus*).** J. Braz. Chem. Soc., 2003, Vol. 14, No. 2, 297-303.

LEITE, O. D.; ZERAIK, E.; SOUZA, F. S. e FATIBELLO-FILHO, O. **Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação.** Quim. Nova, 2008 Vol. 31, No. 4, 731-734.

Lima, A.W.O. **Desenvolvimento de métodos analíticos em sistemas de soluções em fluxo empregando polifenol oxidase naturalmente imobilizada sobre tecidos vegetais.** Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

LIU, Y.; QU, X.; GUO, H.; CHEN, H.; LIU, B. e DONG, S. **Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes–chitosan composite.** Biosensors and Bioelectronics, 2006, 21, 2006, 2195–2201.

LOWINSOHN, D. e BERTOTTI, M. **Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos.** Quim. Nova, 20006, Vol. 29, No. 6, 1318-1325.

MARKO-VARGA, G.; EMNÉUS, J.; GORTON, L e RUZGAS, T. **Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds** Trends Anal. Chem., 1995, 14, 319.

MOROZOVA, O. V.; SHUMAKOVICH, G. P.; SHLEEV, S. V. e YAROPOLOV, Y. I. – **Laccase-mediator systems and their applications: A Review.** Applied Biochemistry and Microbiology, 2007^a, Vol. 43, No. 5, pp. 523–535.

_____; SHUMAKOVICH, G.P.; GORBACHEVA, M.A.; SHLEEV, S.V. e YAROPOLOV, A. I. **“Blue” laccases.** Biochemistry (Moscow), 2007^b, Vol. 72, No. 10, pp. 1136-1150.

ODACI, D.; TIMUR, S.; PAZARLIOGLU, N.; MONTEREALI, M. R.; VASTARELLA, W.; PILLTON, R. e TELEFONCU, A. **Determination of phenolic acids using Trametes versicolor laccase.** Talanta, 2007, 71, 312–317.

ORTIZ, L. P. C.; PABELLO, V. M. L. e PIETRINI, R. V. **Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientais en México.** Revista Internacional de

Contaminación Ambiental, 2007, 23, 001.

OSMA, J.F.; HERRERA, L.J.T. e COUTO, S.R. **Banana skin: a novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions.** Application to synthetic dye decolouration. Dyes and Pigments, 2006, xx, 1-6.

PITA, M.; SHLEEV, S.; RUZGAS, T.; FERNÁNDEZ, V. M.; YAROPOLOV, A. I. e GORTON, L. **Direct heterogeneous electron transfer reactions of fungal laccases at bare and thiol-modified gold electrodes.** Electrochemistry Communications, 2006, 8, 747–753.

PORTACCIO, M.; DI MARTINO, S.; MAIURI, P.; DURANTE, D.; DE LUCA, P. LEPORE, M.; BENCIVENGA, U.; ROSSI, S.; DE MAIO, A. e MITA, D. G. **Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 41, 97–102.

RASOOLY, A. “**Biosensor technologies**”, 2005, *Methods* 37: 1-3.

REEVE, R. N. **Introduction to environmental analysis.** Editora John Wiley & Sons, Ltd, 2002, p.16.

REINHAMMAR, B.R. e VANNGARD, T.I., Eur. J. Biochem., 1971, vol. 18, no. 4, pp. 463–468.

REINHAMMAR, B.R.M. **Oxidation–reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin.** Biochim. Biophys. Acta, 1972, 275, 245–259.

RESOLUÇÃO CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005.

RICCI, F. e PALLESCHEI, G. **Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of prussian blue modified electrodes.** Biosensors and Bioelectronics, 2005, 21, 389–407.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J. e PAGANGA, G. **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.** Free Radical Biology & Medicine, 1996, Vol. 20, No. 7, pp. 933-95.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; MARCO, M-P; DE ALDA, M. J. L. e BARCELÓ, D.

Biosensors for environmental applications: Future development trends. Pure Appl. Chem., 2004, Vol. 76, No. 4, pp. 723–752.

ROGALSKI, J.; DAWIDOWICZ, A. e J'OWZIK, E. Immobilization of laccase from *Cerrena unicolor* on controlled porosity glass. J. Mol. Catal. B: Enzym., 1999, 6, 29–39.

ROGERS, K. R. Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. Analytica Chimica Acta, 2006, 568, 222–231.

ROGERS, K. R.; BECKER, J. Y.; CEMBRANO, J. e CHOUGH, S.H. Viscosity and binder composition effects on tyrosinase-based carbon paste electrode for detection of phenol and catechol. Talanta, 2001, 54, 1059-1065.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N. e KUBOTA, L. T. Biosensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesses ambiental. Quim. Nova, 2001, Vol. 24, No. 1, 77-86.

ROY, J. J.; ABRAHAM, E. T.; ABHIJITH, K. S.; KUMAR, S. P. V. e THAKUR, M. S. Biosensor for the determination of phenols based on cross-linked enzyme crystals (CLEC) of laccase. Biosen. Bioelectronic 2005, 1, 206-211.

SAKURAI, T. e KATAOKA, K. Structure and function of type I copper in multicopper oxidases. Cell. Mol. Life Sci. 64, 2007, 2642 – 2656.

SANCHEZ-AMAT, A. e SOLANO, F. A pluripotente polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas* sp. Shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 240, 787-792.

SÁNCHEZ-FERRER, A.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; GARCÍA-CÁNOVAS, F. e GARCÍA-CARMONA, F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. Biochimica et Biophysica Acta, 1995, 1247, 1-11.

SAPARRAT, M. C. N.; GUILLÉN, F. e ARAMBARRI, A. M. Indutction, isolation, and characterization of two laccases from white rot basidiomycete *Coriolopsis rígida*. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68 (4): 1534 – 1540.

SCHNEIDER, P.; CASPERSEN, K.; MONDFORT, T.; HALKIER, L.K. e SKOV, P.R. Østergaard, K.M. Brown, S.H. Brown, F. Xu. **Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase**. Enzyme Microb. Technol., 1999, 25, 502– 508.

SEMAR, S.; ANKE, H.; GRABNER, K.; ANDER, P.; MESSNER, K.; POPPIUS-LEVLIN, K.; NIKU-PAAVOLA, M-J. e VIIKARI, L. **Screening for fungal oxidative enzymes and evaluation of their usefulness in pulp bleaching**. VAAITAB, 1998, 98, Frankfurt.

SEYDA, K.; BULET, K.; ELIF, E. **An amperometric biosensor based on multiwalled carbon nanotube-poly(pyrrole)-horseradish peroxidase nanobiocomposite film for determination of phenol derivatives**. Talanta 76 (2008) 1147–1152.

SHIN, K.-S. e LEE, Y.-J. **Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus***. Arch. Biochem. Biophys., 2000, 384, 109–115.

SHLEEV, S. V.; KHAN, I. G.; GAZARYAN, I. G.; MOROZOVA, O. V. e YAROPOLOV, A. I. **Novel laccase redox mediators: spectral, electrochemical, and kinetic properties**. Applied Biochemistry and Biootechnology, 2003, 111(3), 167-183.

SHLEEV, S. V; MOROZOVA, O.V.; NIKITINA, O.V.; GORSHINA, E.S. ; RUSINOVA, T. V. ; SEREZHENKOV, V.A. ; BURBAEV, D.S. GAZARYAN, I.G. e YAROPOLOV, A.I. **Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes**. Biochimie, 2004, 86 693–703.

SHLEEV, S.; CHRISTENSON, A.; SEREZHENKOV, V.; BURBAEV, D.; YAROPOLOV, A.; GORTON, L. e RUZGAS, T., Biochem. J. **Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode**. 2005^a, vol. 385, no. 3, pp. 745–754.

_____ ; TKAC, J.; CHISTENSON, A.; RUZGAS, T.; YAROPOLOV, A. I; WHITTAKER, J. W. e GORTON, L. **Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes**. Biosensors and Bioelectronics, 2005^b, 20, 2517–2554.

_____ ; JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; KHALUNINAC, A.; MOROZOVA, O. ;

YAROPOLOV, A. ; RUZGAS, T. e GORTON L. **Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes.** Bioelectrochemistry, 2005^c, 67, 115 – 124.

SHUMAKOVICH, G. P.; SHLEEV, S. V.; MOROZOVA, O. V.; KHOHLOV, P. S.; GAZARYAN, I. G. e YAROPOLOV, A. I. **Electrochemistry and kinetics of fungal laccase mediators.** Bioelectrochemistry, 2006, 69, 16 – 24.

SKOOG, D.A.; HOLLER, J.F. e NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental.** Trad. Inez Caracelli... [et al].- 5.ed.- Porto Alegre: Bookman, 2002.

SILVA, C. J. M.; SAMANIA JUNIOR, A.; ZANETTI, C. R. e STEINDEL, M. **Atividade de antiparasitária e antiviral de *Pycnoporus sanguineus*.** Dissertação. UFSC, 2001.

SOLOMON, E.I.; SUNDARAM, U.M. e MACHONKIN, T.E. **Multicopper oxidases and oxygenases.** Chem. Rev., 1996, 96 2563–2605.

SOLOMON, E. I.; BALDWIN, M. J. e LOWERY, M. D. **Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity.** Chem. Rev., 1992, 92, 521-542.

SOUZA, C. G. M. e PERALTA, R. M. **Purification and characterization of the main laccase produced by the white -rot *Pleuotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures.** Journal of Basic Microbiology, 2003, v. 43, n. 4, p. 278-286.

STETTER, J. R.; PENROSE, W. R. e YAO, S. **Chemical sensors, electrochemical sensors, and ECS.** Journal of The Electrochemical Society, 2003, 150 (2) S11-S16.

TEMBE, S.; INAMDAR, S.; HARAM, S.; KARVE, M. e D'SOUZA, S. F. **Electrochemical biosensor for catechol using agarose–guar gum entrapped tyrosinase.** Journal of biotechnology, 2006. Short communication.

THURSTON, C, F. **The structure and function of fungal laccases.** Microbiology.,1994 140:19-26.

TOTHILL, I. E. **Comput. Electron. Agric.**, 2001, 30, 205–218.

TROJANOWICZ, M. **Analytical applications of carbon nanotubes: a review**: Trends Anal. Chem., 2005, 20, 1-10.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K. e FIECHTER, A. **Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay**. J. Biotech., 1995, 41: 1-17.

VAMVAKAKI, V. e CHANIOTAKIS, N. A. **Pesticide detection with a liposome-based nano-biosensor**. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 22, 2848–2853.

VIANELLO, F.; CAMBRAIA, A.; RAGUSA, S; CAMBRAIA, M. T.; ZENNARO, L. e RIGO, A. **A high sensitivity amperometric biosensor using a monomolecular layer of laccase as biorecognition element**. Biosensors and Bioelectronics, 2004, 20,, 315–321.

VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, A. C.; GRANATO, A.C. e LUPETI, K. O. **Titulação amperométrica de compostos fenólicos usando polifenol oxidase de vegetal como titulante.** Eclética química. www.scielo.br/eq, 2004, Volume 29, número 2.

XU, F. **Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition**. Biochemistry, 1996, 35, 7608– 7614.

XU, F.; SHIN, W.; BROWN, S.H.; WAHLEITHNER, J.A.; SUNDARAM, U.M. e SOLOMON, E.I. **A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity. and stability**, Biochim. Biophys. Acta, 1996, 1292, 303–311.

YAROPOLOV, A.I.; SKOROGAT'KO, S. S; VARTANOV, S.D. **Laccase: Properties, catalytic mechanism, and applicability**. Appl. Biochem. Biotechnol., 1994, 49, 257–280.

YAROPOLOV, A. I.; KHARYBIN, A. N. ; EMNEUS, J.; MARKO-VARGA, G. e GORTON, L. **Flow-injection analysis of phenols at a graphite electrode modified with co-immobilised lactase and tyrosinase**. Analytica Chimica Acta, 1995, 308, 137-144.

YAVER, D. S.; XU, F.; GOLIGHTLY, E. J.; BROWN, K. M.; BROWN, S. H.; REY, M. W.; SCHNEIDER, P.; HALKIER, T.; MONDORF, K. e DALBOGE, H. **Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*.** Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62, 834-841.

YONZON, C. R.; STUART, D. A.; ZHANG, X.; MCFARLAND, A. D.; HAYNES, C. L. e VAN DUYNE, R. P. **Towards advanced chemical and biological nanosensors—An overview.** Talanta, 2005, 67, 438–448.

WAHLEITHNER, J. A.; XU, F.; BROWN, K. M.; BROWN, S. H.; GOLIGHTLY, E. J.; HALKIER, T.; KAUPPINEN, S.; PEDERSON, A. e SCHNEIDER, P. **The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*.** Curr. Genet., 1996, 29, 395-403.

ZEJLI, H.; HIDALGO-HIDALGO DE CISNEROS, J. L.; NARANJO-RODRIGUEZ, I.; BAOHONG, L.; TEMSAMANIB, K. R. e MARYTYA, J.L. **Phenol biosensor based on Sonogel-Carbon transducer with tyrosinase alumina sol-gel immobilization.** Analytica chimica acta, 2008, 612, 198–203.

ZILLE, A. **Laccase Reactions for Textile Applications.** Tese de doutoramento, 2005.

GLOSSÁRIO

Bioconcentração: Compostos orgânicos que contêm grupos polares tais como, -OH (muitos destes, são compostos fenólicos) e -NH₂, ou iônicos, que possuem baixa solubilidade em água. Nos grupos de compostos relatados, a solubilidade diminui com aumento da massa molecular. Como a solubilidade em água diminui, a solubilidade em solventes orgânicos aumenta. Este aumento na solubilidade é igualmente verdadeiro se nós considerarmos a solubilidade em tecidos gordos nos peixes e mamíferos aquáticos (REEVE, 2002).

Biomarcadores: Um biomarcador é definido como uma mudança em uma resposta biológica (obtido através de respostas celular e fisiológica, devido à alterações moleculares) o qual pode estar relacionado à exposição ou à efeitos tóxicos de produtos químicos presentes no meio ambiente. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, biomarcadores podem ser subdivididos em três classes: biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de suscetibilidade (ALLAN *et al.*, 2006).

Biorremediação: é a capacidade de certos microorganismos para transformar moléculas orgânicas complexas em constituintes inorgânicos mais simples (RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2004).

ANEXO A – Biossensores comerciais para aplicações ambientais

Tabela 2.3. Biossensores para aplicações ambientais.

Elemento de Transdução	Elemento de reconhecimento biológico	Analito	Características	Matriz
1	2	3	4	5
Eletroquímico (amperométrico)	Anticorpos	Atrazina	LD: 1 µg/L	*
Optical (onda-guia SPR)	Anticorpos	Simazina	LD: 0.2 µg/L	Águas natural, subterrânea e de superfície
Óptico	Anticorpos	Pesticidas e estrona	Validação	Água de rio
Eletroquímico	Anticorpos	Surfactantes (alquilenois e seus etoxilatos)	LD: µg/L faixa	*
Eletroquímico (amperométrico)	Anticorpos	Estradiol	LD: 1 ng/L	*
Eletroquímico (potentiométrico)	Anticorpos	<i>Escherichia coli</i>	10 células/mL	Água potável
Óptico (SPR)	Anticorpos	<i>Salmonella enteriditidis</i> , <i>Lysteria monocytogenes</i>	10 ⁶ células/mL	*
Acústico	Anticorpos	<i>Salmonella typhimurium</i>	100 células/mL	*
Óptico (fibra óptica)	Enzima (AchE)	Compsotos Organofosforados	LD: 2 mg/L	Água
Eletroquímico (amperométrico)	Enzima (AchE)	Paraoxon e carbofuran (pesticidas)	Discriminação entre diferentes inibidores de AChE por redes neurais LD: 0.2 µg/L	Esgoto
Eletroquímico (amperométrico)	Enzimática (tiroxinase)	Fenóis	LD: 0.1 µg/L “índice de fenol” correlação	Solo, lodo e água (extração posterior)
Eletroquímico	Enzimática (celobiose dehidrogenase e quinoproteína-dependente glicose dehidrogenase)	Fenóis	Medidas em campo LD: 0.8 µg/mL	Esgoto
Óptico quiromioluminescência (fibra óptica)	Enzimática (“horseradish” peroxidase)	Clorofenóis	LD: 1.4–1975 µg/L	*
Eletroquímico (amperométrico)	Enzimática (configuração trienzimática)	Fosfato inorgânico	LD: 0.57 mg/L	*
Electrochemical (amperometrico)	Enzimática (tiroxinase)	<i>E. coli</i>	10 ³ –10 ⁴ células /mL	Esgoto
Electrochemical (amperometrico)	Fotosistema (PSII)	II Diuron Atrazina Simazina	LD: 0.233 µg/L LD: 0.431 µg/L LD: 0.806 µg/L	*
Óptico (fluorescência)	<i>Scenedesmus subspicatus</i> (células de alga)	Atrazina e endrina (herbicidas)	1 ou 0.1 µg/L	*

Continuação da Tabela 2.3

1	2	3	4	5
Óptico (fluorescência)	<i>Chlorella vulgaris</i> (células de alga)	Isoproturon, diuron, simazina	0.025 µg/L 0.5 µg/L	*
Eletroquímico (amperométrico)	<i>Pseudomonas e</i> <i>Achromobacter</i> (suporte de plasmídeo de degradação de surfactante aniônico)	Surfactantes	LD: 0.25 mg/L (SDS)	*
Eletroquímico (amperométrico) (O ₂ medida do consumo de O ₂)	<i>Trichosporon</i> <i>cutaneum</i> (LAS degradante de bactéria)	LAS	Medidas no local LD: 0.2 mg/mL	Água de rio
Óptico (SPR)	Receptor estrogênio	de EDCs		*
Óptico (SPR)	Receptor estrogênio	de EDCs	0.1 µg/l (Estradiol)	Água de lago
Eletroquímico (voltametria cíclica)	Receptor estrogênio	de EDCs	0.02 µg/l (Estradiol)	*
Eletroquímico (amperométrico)	<i>E. coli</i>	Toxicidade		Esgoto
Óptico (bioluminescência)	Geneticamente criado por bactéria bioluminescente	Toxicidade	Portátil	*
Eletroquímico (amperométrico)	Cultura multiespécies	de BOD	Mínimo mensurável BOD = 0.088 mg/L O ₂ ; (biosensor BOD/BOD ₅) razão = 0.80	Esgoto municipal e industrial
Óptico (fibra óptica)	<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i>	Baixa BOD	Mínimo mensurável BOD = 0.5 mg/L O ₂ ; comparação com BOD ₅ : r ² = 0.971	Água de rio
Óptico (bioluminescência)	<i>E. coli</i> (com gene luciferase de vag- lume)	Zinco Dicromato Cromato	2.6 mg/L 1.6 mg/L 2.6 mg/L	Solo(extrato)
Óptico (bioluminiscência)	<i>E. coli</i> (com gene <i>mer-lux</i>)	Mercúrio	0.2 µg/Kg	Solo (extrato)
Óptico (bioluminiscência)	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> (com sensores de plamídeos)	Mercúrio Arsenito	0.003 µg/Kg 0.7 µg/Kg	Solo (extrato)
Eletroquímico (cronopotentiometria)	DNA	Daunomicina PCBs, Aflatoxina	LD: 0.3 mg/L LD: 0.2 mg/L LD: 10 mg/L	Água de rio (pré-concentrada)
Eletroquímico (cronopotentiometria)	DNA (hibridização)	<i>Chlamydia</i> <i>trachomatis</i> DNA)	Aplicação prévia de PCR	Água de rio (pré-concentrada) LD: 0.2 mg/l
Piezoelétrico	DNA (hibridização)	<i>Aeromonas</i> <i>hydropthila</i>	Extração prévia de DNA e aplicação de etapas de PCR	Água mineral e potável

*Amostra não real.

Fonte: RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2004.

ANEXO B – Características de lacases isoladas de diferentes fontes

Tabela 2.5. Algumas características de lacases isoladas de diferentes fontes.

Lacase	Massa molecular, Da	Carbohidratos, %	Ponto isoelettrico	Temperatura ótima (°C)	Tempo de meio vida ($T_{1/2}^*$, h)
1	2	3	4	5	6
Lacases de plantas					
<i>Rhus vernicifera</i>	110	45			
<i>Rhus succedanea</i>	130				
<i>Acer pseudoplatanus</i>	97	40-45			
<i>Pinus taeda</i>	90	22			
<i>Liriodendron tulipifera</i>	61		9.3-9.5		
Lacases de fungos					
<i>Agaricus bisporus</i>	65	15			
<i>Agaricus blazei</i>	66		4.0	20	
<i>Basidiomycete PM1</i>	64	6.5	3.6	80	
<i>Botrytis cinerea</i>]	74	49	4.0	60	
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	L1	71	15	3.4	$T_{1/2}^{60} = 2$
	L2	68	10	4.8	$T_{1/2}^{60} = 1$
<i>Cerrena maxima</i>]		67	13	3.5	$T_{1/2}^{50} = 52$
<i>Cerrena máxima</i>		57	13	3.5	$T_{1/2}^{40} = 12$
<i>Cerrena unicolo</i>		66		3.95	$T_{1/2}^{60} = 2,5$
<i>Cerrena unicolor</i> 0784		56	23	3.75	
<i>Cerrena unicolor</i> 137	Lacc I	64		3.6	60
	Lacc II	57		3.7	60
<i>Chaetomium thermophilum</i>		77		5.1	60
<i>Coprinus cinereus</i>		58		4.0	60
<i>Coriolopsis fulvocinerea</i>		54	32	3.5	
<i>Coriolopsis fulvocinerea</i>		65	32	3.5	$T_{1/2}^{50} = 64$
<i>Coriolopsis gallica</i>		84	21	4.3	70
<i>Coriolopsis rigida</i>		66	9	3.9	$T_{1/2}^{60} = 192$
<i>Coriolus hirsutus</i>		73	11	7.4	45
<i>Coriolus hirsutus</i>		55	12	4.0	$T_{1/2}^{50} = 72$
<i>Coriolus zonatus</i>		60	10	4.6	55
<i>Daedalea quercina</i>		69		3.0	60
<i>Gaeumannomyces graminis</i>		190	12	5.6	$T_{1/2}^{65} = 0.5$
<i>Magnaporthe grisea</i>		70		6.0	30
<i>Marasmius quercophilus</i>		63	12	3.6	75
<i>Mauginiella</i> sp.		63	5-7	4.8-6.4	$T_{1/2}^{60} = 0.7$
<i>Melanocarpus albomyces</i>		80		4.0	$T_{1/2}^{60} = 5$
<i>Neurospora crassa</i>		65	11		$T_{1/2}^{50} = 72$

Continuação da Tabela 2.5

1	2	3	4	5	6
<i>Panus rufus</i>	58	8	3.5	60	
<i>Panus tigrinus</i>	69.1	6.9	3.15	55	$T_{1/2}^{60} = 0,4$
<i>Phellinus ribis</i>	152	28	4.1		
<i>Pleurotus eryngii</i>	I	65	7	65	$T_{1/2}^{50} = 0,5$
	II	61	1	4.2	$T_{1/2}^{55} = 0,5$
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA1b	62	3	6.9	20-50	$T_{1/2}^{60} = 3$
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA1w	61	9	6.7	45-65	$T_{1/2}^{60} = 3,3$
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA2	67		4.0	25-35	$T_{1/2}^{60} = 0,2$
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA3a	83-85		4.1	35	$T_{1/2}^{40} = 6$
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA3b	83-85		4.3	35	$T_{1/2}^{40} = 14$
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXC	59	5	3.3	50-60	$T_{1/2}^{60} = 0,5$
<i>Polyporus versicolor</i> A	64.4	14	3.0-3.2		
	B	64.7	10	4.6-6.7	
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	81	9	3.7		$T_{1/2}^{70} = 1$
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	63	11	3.0		$T_{1/2}^{80} = 2$
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	58		6.7	55	$T_{1/2}^{75} = 3$
<i>Rhizoctonia solani</i>	130	10	7.5		
<i>Rigidoporus lignosus</i>	54		3.2	40	$T_{1/2}^{65} = 0,5$
<i>Sclerotium rolfsii</i>	55		5.2	62	$T_{1/2}^{60} = 1$
<i>Trametes gallica</i> Lac I	60	3.6	3.1	70	
	Lac II	60	4	3.0	70
<i>Trametes hirsuta</i>	70	12	4.2		$T_{1/2}^{50} = 65$
<i>Trametes ochracea</i>	64	10	4.7		$T_{1/2}^{50} = 56$
<i>Trametes pubescens</i> Lc1	67	13	5.1		
	Lc2	67	13	5.3	
<i>Trametes pubescens</i>	65	18	2.6		
<i>Trametes versicolor</i> I	67	10-12			
	II	70			
<i>Trametes villosa</i> 1	130	14	3.5		
	3	126	7	6.5	
<i>Trametes</i> sp. C30	65		3.2		
<i>Trametes</i> sp. AH28-2	62	11-12	4.2		$T_{1/2}^{75} = 0,5$
<i>Trichophyton rubrum</i>	65		4.0		$T_{1/2}^{60} = 0,25$

* Meio tempo de inativação da enzima à temperatura indicada.

Fonte: Morozova^b et al., 2007.

ANEXO C – Centro de cobre tipo I

Tabela 2.6. Centro de cobre azul, centro de cobre tipo I e variante com seu doador fixo e potencial redox

Tipo de Cu	Proteína	Doador para Cu	Potencial Redox (T1) (mV versus NHE)
Centro de Cu azul	Plastocianina	1Cys2His1Met	350–370
	Azurina	1Cys2His1Met	266–305
	Pseudoazurina	1Cys2His1Met	260–269
	Amicianina	1Cys2His1Met	294
	Rusticianina	1Cys2His2Met	680
	Auracianina	1Cys2His2Met	
	Halocianina	1Cys2His1Met	183 (alta dependência de pH)
	Plantacianina(CBP)	1Cys2His1Met	317
	Umeceanina	1Cys2His1Gln	283
	Mavicianina	1Cys2His1Gln	285
	Stellacianina	1Cys2His1Gln	180–260
Centro de Cu vermelho	Nitrosocianina	1Cys2His1Glu1H2O	85
Cu _A	Citocromo oxidase	2Cys2His1Met1Glu	260
	Oxido nitroso reductase	2Cys2His1Met1Trp	260
Centro de Cu tipo I	Lacase de planta	1Cys2His1Met	394
	Ascorbato oxidase	1Cys2His1Met	344–370
	CueO	1Cys2His1Met	364
	PcoA	1Cys2His1Met	
	CumA, MofA, MnxG	1Cys2His1Met	
	EpoA	1Cys2His1Met	
	CotA	1Cys2His1Met	455
	Dihidrogeodina oxidase (sulocrina oxidase)	1Cys2His1Met	
	Nitrito redutase	1Cys2His1Met	240–260
	Hefaestina	1Cys2His1Met	
	Ceruloplasmina	1Cys2His1Met/1Leu	490, 580, >1000
	Fenoxazinona sintase	1Cys2His1Met	
	Bilirubina oxidase	1Cys2His1Met	680
	Fet3p	1Cys2His1Leu	433
	Lacase de fungo	1Cys2His1Phe/Leu	550–785

Fonte: SAKURAI e KATAOKA, 2007

ANEXO D - Propriedades de diferentes biossensores

Tabela 2.8. Propriedades de diferentes biossensores.

Transdutor	Fungo Fonte de lacase	Eletrodos de:	Imobilização da lacase	Mediator	pH Temperatura de melhor resposta (°C)	Substratos	E (mV)	Fonte bibliográfica
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Amperométrico	<i>Polyporus pinitus</i> e <i>Myceliophthora thermophila</i>	Grafite e grafite impresso	Albumina bovina e glutaraldeído		5.5 25	Fenóis	-100	KULYS e VIDZIUNAITE, 2003
Amperométrico (a solução tampão foi deaerada com N ₂)	<i>Trametes versicolor</i>	Oxigênio commercial e ferroceno modificado com grafite impresso	Pasta de grafite	Ferroceno	4.5 35	Ácidos cafeico, ferrúlico, síringico, áscorbio e úrico e paracetamol.	0,28	ODACI <i>et al.</i> , 2007.
Amperométrico	<i>Rigidoporus lignosus</i>	Carbono	<i>N</i> -(3-dimetillaminopropil)- <i>N</i> -etil carbodiimida, hidroxisuccinimida e ácido 3-mercaptopropionico sobre ouro.		7.0	Fenóis de óleo de oliva, 1,4-Hidroquinona		VIANELLO <i>et al.</i> , 2004
Amperométrico (voltametria cíclica)	<i>Coriolus versicolor</i>	Calomelano vs. platina	Derivados de polietersulfona		3,5	Ácido cafeico Catequina	+100	GOMES <i>et al.</i> , 2004
Amperométrico	<i>Coriolus versicolor</i>	Platina Ag/AgCl Calomelano saturado			4.5	Catecol Catequina Ácido cafeico Rutina	-200 +100 -50 -400	GOMES e REBELO, 2003
Óptico			3-methyl-2-benzotiazolinona; quitosana; silicato		6.0	Catecol, Guaiacol, <i>o</i> -cresol, <i>m</i> -cresol.	nr nr nr	ABDULLAH <i>et al.</i> , 2007

Continuação da Tabela 2.8

Continuação da Tabela 2.8

1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Amperométrico	<i>Trametes versicolor</i>	Grafite Platina e Ag/AgCl	Ácido nítrico, <i>N,N</i> -dicicloexilcarbodiimida, hexametilenediamina e glutaraldeído, carbodiimida.		5.0 25	Catecol	-100	PORTACCIO <i>et al.</i> , 2006	
Eletroquímico clássico	<i>Trametes versicolor</i>	Microeletrodos de fibra de carbono, Calomelano e Platina	Carboimida, Glutaraldeído		5.0	Catecol	-100	FREIRE <i>et al.</i> , 2001	
Amperométrico (voltametria cíclica e cronoamperometria)	<i>Coriolus versicolor</i>	Carbono vítreo Platina Ag/AgCl	Nanotubos de carbono e quitosana	ABTS	5.0 – 7.0 18	Catecol		LIU <i>et al.</i> , 2006	
Amperométrico (voltametria cíclica)	<i>Trametes hirsuta</i> , <i>Trametes ochracea</i> <i>Cerrena maxima</i>	Ouro Ag AgCl KCl Platina Hg Hg ₂ Cl ₂ KCl	Tióis: viz. cistamina, L-cisteína, e 4-aminotiofenol		5.0	ABTS	+140 a +1040 -60 a - 1360 +60 a +1840 +790	PITA <i>et al.</i> , 2006	
Amperométrico (Voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e potenciometria.)	<i>Trametes ochracea</i> <i>Trametes hirsuta</i> <i>Cerrena maxima</i> <i>Cerrena unicolor</i> <i>Coriolopsis fulvocinerea</i>	Grafite espectrográfico e grafite pirolítico. Referência: Ag AgCl 3 M NaCl			3.7–4.9 3.5–4.5 3.5–4.5 4.0–6.0 3.9–5.2	Catecol K ₄ Fe(CN) ₆		SHLEEV <i>et al.</i> , 2005b	
Amperométrico	<i>Trametes versicolor</i>	SCE	vitrocerâmica porosa, carboimida, glutaraldeído, grafite pirolítico	1-hidroxi-benzotriazol	5,0 20	Efleunte E1, catecol	Kraft	-100	CORDI <i>et al.</i> , 2007
nr: não respondeu									