

“BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS - ELETRODOS DE MATERIAIS CARBONÁCEOS COM LACASE IMOBILIZADA”

Nos últimos anos, as fibras de carbono têm sido largamente estudadas em processos eletroquímicos e eletroanalíticos, principalmente na construção de microeletrodos (Agüi e col., *Electroanalysis* 9 (1997) 468; Carvalho e col., *J. Electroanal. Chem.* 457 (1998) 83). Uma importante vantagem apresentada pelos eletrodos de fibras de carbono é presença de grupos carboxílicos e hidroxilícos em sua superfície, que permitem sua modificação e imobilização de muitas espécies, dentre as quais enzimas (Ju e col., *Talanta* 43 (1996) 1177). Esta última característica, pode ser empregada na construção de biossensores eletroquímicos, desde que a imobilização de biomoléculas na superfície dos eletrodos possui um papel fundamental no desenvolvimento deste tipo de sensor (Kröger e col., *Biosens. Bioelectron* 14 (1999) 155). O emprego de microbiossensores apresenta grandes vantagens na determinação de, por exemplo, metabólitos e poluentes *in vivo* e *in situ* (Cosnier, *Biosens. Bioelectron* 14 (1999) 443). Entretanto, a imobilização de macrobiomoléculas, na sua forma estável e com a manutenção de suas propriedades biológicas de reconhecimento sobre microsuperfície condutoras apresenta-se como um dos grandes desafios para a construção de biossensores miniaturizados (Nistor e col., *Waste Manage* 19 (1999) 147; Heilmann e col., Patente DE19835869-A1). Os procedimentos de ligação cruzada, ligação covalente e encapsulamento em géis ou membranas são os métodos de imobilização de biomoléculas mais convencionais. Contudo, em alguns casos estes processos apresentam uma baixa reprodutibilidade, além de problemas de homogeneidade durante o processo de deposição das biomoléculas sobre a superfície dos eletrodos (May, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (1999) 370). A fim de se obter eletrodos que apresentem alta sensibilidade, é necessário que a molécula do substrato possa interagir com superfície sem restrições estéricas. Idealmente, este objetivo pode ser atingido através da imobilização da parte protéica, em um ponto que não afete o centro ativo da enzima.

Biossensores apresentam-se como uma ferramenta ideal no monitoramento

ambiental, principalmente devido a sua habilidade em operar com matrizes complexas, curto tempo de resposta e pequeno tamanho (Dennison e col., *Biotech. Adv.* 13 (1995) 1). A determinação de fenol e seus compostos derivados é de extrema importância ambiental, desde que estas espécies são largamente despejadas no meio ambiente por um grande número de indústrias, como por exemplo: manufatura de plásticos, corantes, drogas, antioxidantes, polpa e papel (Nistor e col., *Anal. Chim. Acta* 387 (1999) 309). Nos últimos anos biossensores eletroquímicos modificados com as enzimas tirosinase (Russel e col., *Anal. Chim. Acta* 389 (1999) 161), HRP (Rosatto e col., *Anal. Chim. Acta* 390 (1999) 65) e lacase (Yaropolov e col., *Anal. Chim. Acta*, 308 (1995) 137; Bogdanovs e col., Patente DD280790-A) têm sido desenvolvidos para a determinação de fenóis. O uso de extratos brutos oferece algumas vantagens com relação aos procedimentos baseados em enzimas puras ou isoladas, especialmente por promover um maior tempo de vida e menor custo (Vieira e col., *Anal. Letters* 30 (1997) 895).

O biossensor apresentado nesta invenção foi construído utilizando-se cerca de 10-20 fibras de carbono (5mm de espessura) e extrato bruto de lacase obtido a partir do fungo *Trametes versicolor*.

Antes da imobilização enzimática as fibras foram pré-tratadas com a aplicação de um potencial estacionário de +0,8 V por 180 segundos, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2. Após este processo a imobilização da lacase sobre as fibras de carbono foi realizada por quatro diferentes processos: adsorção física, ligação covalente com carbodiimida, ligação cruzada com glutaraldeído e ligação covalente com carbodiimida/glutaraldeído.

A Tabela 1 mostra a sensibilidade dos biossensores na determinação de catecol, obtida para cada processo de imobilização enzimática, estes valores foram obtidos com a aplicação de potencial no valor de -100 mV vs SCE em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0. Os resultados mostram que o método de imobilização enzimático via adsorção física resulta em um biossensor com baixa sensibilidade, enquanto que os métodos com glutaraldeído e carbodiimida apresentam biossensores com melhores sensibilidades. A carbodiimida é capaz de promover uma forte ligação entre a enzima e o eletrodo, entretanto esta fixação é feita através

de grupos carboxílicos, sendo que o centro ativo da lacase pode conter este tipo de grupo. Desta forma, a imobilização através da carbodiimida pode levar a uma redução na atividade enzimática. Por outro lado, o glutaraldeído promove uma boa reticulação enzimática aumentando a quantidade de enzima por área, mas não é efetivo na fixação das enzimas reticuladas sobre a superfície do eletrodo.

O procedimento para a imobilização de lacase sobre as fibras de carbono foi obtido utilizando-se carbodiimida e glutaraldeído simultaneamente, devido ao efeito sinérgico entre estas duas metodologias isoladas, combinando a boa fixação apresentada pelo método com carbodiimida com a boa reticulação obtida pelo método com glutaraldeído, resultando em um biossensor com alta sensibilidade.

A Tabela 1 mostra o aumento na sensibilidade do biossensor em função do aumento da porcentagem de glutaraldeído % (m/v). Para soluções com porcentagens de glutaraldeído acima de 10% foi observado uma diminuição na atividade enzimática, provavelmente devido a um alto grau de reticulação enzimática, promovido pelo glutaraldeído, que dificulta o acesso do substrato ao centro ativo da enzima.

A Figura 1 mostra o efeito do pH na resposta do biossensor (solução de catecol $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, potencial aplicado: -100 mV vs SCE). Para soluções com pH acima de 6,5 a sensibilidade do biossensor decresce rapidamente, sendo que um máximo de resposta é obtido em pH ao redor de 5,0. Esta faixa ótima de pH é similar a observada para lacases solúveis e purificadas. Isto indica que o processo de imobilização não afeta a carga da enzima.

O potencial aplicado durante a medida eletroquímica exerce um forte efeito sobre a resposta do biossensor, conforme mostra a Figura 2 (solução de catecol $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 5,0). Apesar da resposta do biossensor aumentar em potenciais mais negativos, fixou-se o valor de -100 mV , devido a este potencial apresentar uma boa razão sinal/ruído e estar menos sujeito a interferências de compostos não fenólicos, principalmente em matrizes complexas.

A curva analítica, obtida para catecol, usando o biossensor desenvolvido com o método carbodiimida/glutaraldeído (potencial aplicado: -100 mV vs SCE , eletrólito suporte: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0) mostrou uma faixa linear de resposta

entre 1 e 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$, conforme mostra a Figura 3. A equação de ajuste desta curva é dada por $i(nA) = 0.33 (\pm 0.15) + 16.10 (\pm 0.25) [\text{catecol}](\mu\text{mol L}^{-1})$, com um coeficiente de correlação de 0,9998 para $n = 25$. Deste modo, o biossensor desenvolvido apresentou uma excelente faixa operacional e ótima sensibilidade.

5 A constante aparente de Michaelis-Menten deste biossensor foi estimada em 0,61 mmol L^{-1} (catecol como substrato), para lacase em solução o valor encontrado foi de 3,9 mmol L^{-1} . Este resultado mostra que o procedimento de imobilização promoveu um aumento significativo na seletividade da lacase.

10 O biossensor desenvolvido mostrou-se eficiente na detecção e quantificação de diferentes compostos fenólicos e clorofenóis em matrizes ambientais, demonstrando sua importância no monitoramento ambiental de efluentes industriais.

Tabela 1

Método de imobilização	Sensibilidade (nA / $\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Coeficiente de correlação (r^2)	C.V (%)
Adsorção física	0.60 ± 0.05	0.989	10.2
Ligação cruzada com glutaraldeído 10%	2.05 ± 0.09	0.995	5.1
Ligação covalente com carbodiimida	3.69 ± 0.17	0.996	4.7
Carbodiimida + glutaraldeído 1.5%	6.49 ± 0.148	0.998	2.8
Carbodiimida + glutaraldeído 2.5%	9.12 ± 0.23	0.998	2.6
Carbodiimida + glutaraldeído 5%	14.32 ± 0.27	0.999	1.9
Carbodiimida + glutaraldeído 10%	16.07 ± 0.27	0.999	1.7
Carbodiimida + glutaraldeído 15%	1.13 ± 0.05	0.989	5.6

REIVINDICAÇÕES

1. **"BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS - ELETRODOS DE MATERIAIS CARBONÁCEOS COM LACASE IMOBILIZADA"**, caracterizado pelo desenvolvimento, descrição, montagem e
5 otimização de um biossensor amperométrico, capaz de discriminar e quantificar diferentes compostos fenólicos.
2. **"BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS - ELETRODOS DE MATERIAIS CARBONÁCEOS COM LACASE IMOBILIZADA"**, caracterizado pela imobilização de lacase em eletrodos de
10 materiais carbonáceos, principalmente em fibra de carbono, para a determinação de compostos fenólicos.
3. **"BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS - ELETRODOS DE MATERIAIS CARBONÁCEOS COM LACASE IMOBILIZADA"**, caracterizado pelo uso de extrato bruto de lacase produzida por
15 fungos como, por exemplo, o *Trametes versicolor*.
4. **"BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS - ELETRODOS DE MATERIAIS CARBONÁCEOS COM LACASE IMOBILIZADA"**, caracterizado pelo uso em análises de efluentes industriais.

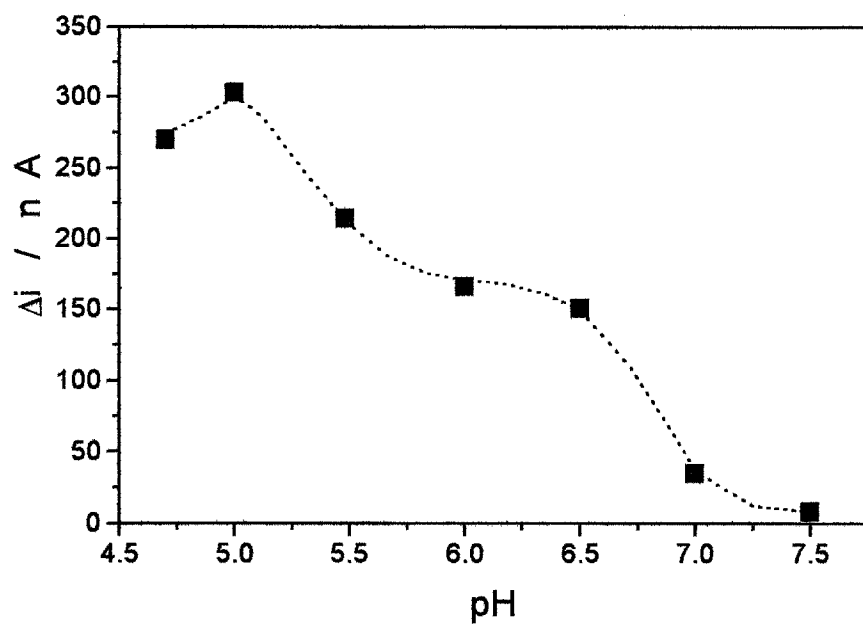


Figura 1

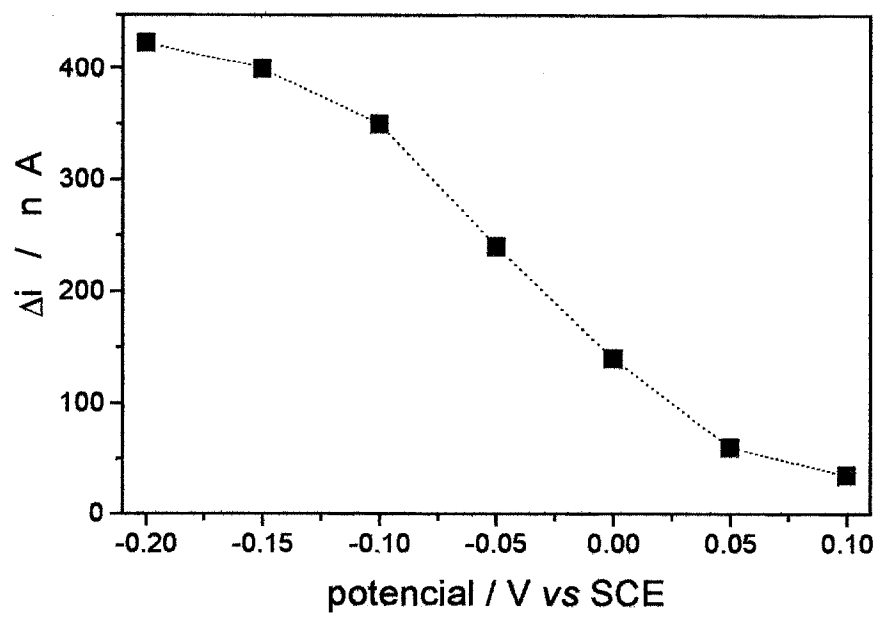


Figura 2

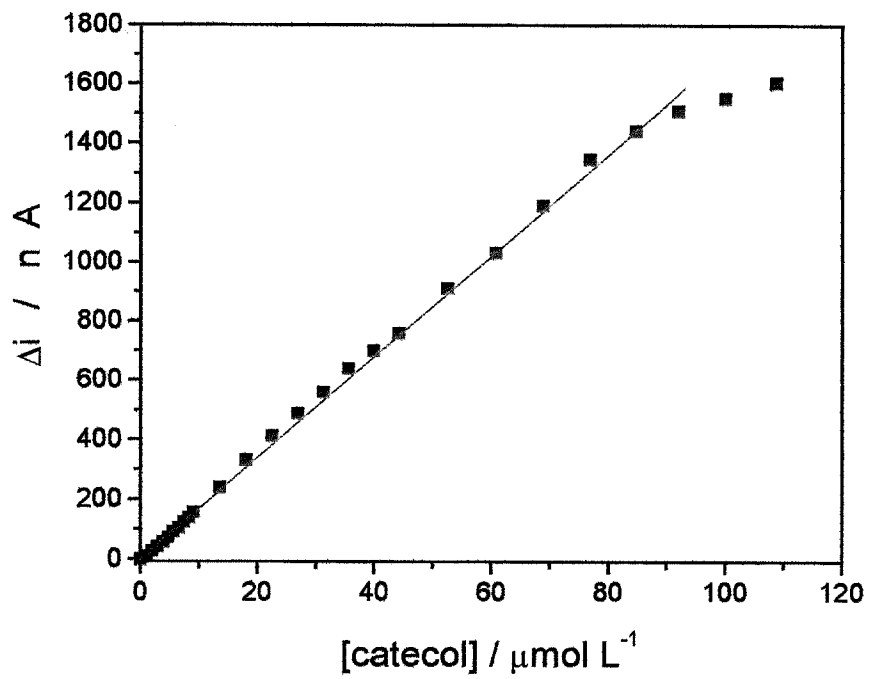


Figura 3

RESUMO

"BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS - ELETRODOS DE MATERIAIS CARBONÁCEOS COM LACASE IMOBILIZADA"

5 Este processo descreve o desenvolvimento de biossensores amperométricos para compostos fenólicos. Lacase (extrato bruto) foi imobilizada em eletrodos de fibra de carbono utilizando-se diferentes processos: adsorção física, glutaraldeído, carbodiimida e carbodiimida/glutaraldeído.

10 O biossensor de maior sensibilidade foi obtido usando a imobilização com carbodiimida/glutaraldeído. Neste método, diferentes porcentagens de glutaraldeído mostraram um importante efeito na sensibilidade do biossensor. O comportamento do biossensor foi testado em termos da sensibilidade, faixa operacional, pH e potencial aplicado. O biossensor desenvolvido mostrou uma resposta máxima em 15 pH 5,0 e com o potencial de -100 mV. A lacase imobilizada manteve sua atividade por mais de dois meses.