



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANALICE PADOVAN CORTES

**"BIOSSENSORES PARA DOPAMINA: LACASE  
IMOBILIZADA EM POLISSACARIDEO"**

---

LONDRINA  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANALICE PADOVAN CORTES

**" BIOSSENSORES PARA DOPAMINA: LACASE  
IMOBILIZADA EM POLISSACARIDEO "**

Manuscrito da Qualificação apresentada ao Curso de Mestrado em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/CCE da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia

Co-Orientadora: Profa. Dra. Aneli M. Barbosa

LONDRINA  
2008

CORTES, Analice Padovan. "**Biossensores para Dopamina: Lacase Imobilizada em Polissacarideo**" 2008. 88p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## RESUMO

O fungo isolado *Botryosphaeria* (MAMB 05) caracterizado como *B. rhodina* foi utilizado no presente trabalho como fonte de lacase e exopolissacarideo. O exopolissacarideo botriosferana foi depositado juntamente com a enzima lacase através da técnica de automontagem ("layer by layer") em camadas adsorvida alternadamente com policações (PDDA - poli(dialildimetilamônio cloreto). A formação das multicamadas alternadas entre polieletrólito e enzima foi demonstrada pela técnica de microbalança de quartzo. Os biocompósitos formados apresentam atividade catalítica enzimática, que é proporcional ao número de camadas de enzima depositada. Voltamogramas cíclicos indicam a presença de eletroatividade com um par redox a 0,625 e 0,432 V, reversíveis e controlados por difusão. Os filmes foram empregados na detecção de dopamina, com limite de quantificação de  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, usando ABTS (diamônio de 2-2'-azina-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico ácido) como mediador.

**Palavras-chave:** *Botryosphaeria rhodina*, Botriosferana, Lacase, Biocompósito, Automontagem, Dopamina, ABTS

CORTES, Analice Padovan. **"Biosensor for Dopamine: Laccase Immobilized on Polysaccharides."** 2008. 88p. Dissertation (Master Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

### ABSTRACT

An isolate of *Botryosphaeria* (MAMB 05) characterised as *B. rhodina* has been used regarding its production of laccases and exopolysaccharides. The polysaccharide Botryosphaerean microfibers were coated with enzymes laccase through layer-by-layer assembly by alternate adsorption with oppositely charged polycations (PDDA (poly(diallyldimethylammonium chloride))). The formation of organized polyelectrolyte and enzyme multilayer films was demonstrated by quartz crystal microbalance. These biocomposites retained enzymatic catalytic activity, which was proportional to the number of coated enzyme layers. Cyclic voltammograms presented well-defined electroactivity with a redox pair at 0.625 and 0.432 V, reversibility, a diffusion controlled process. The films were employed successfully in dopamine detection, with quantification limit of  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, respectively, using ABTS (diammonium de 2-2'-azine-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) as mediator.

Keywords: *Botryosphaeria rhodina*, Botryosphaerean, Laccase, Biocomposite, layer by layer assembly, Dopamine, ABTS.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Estrutura molecular da botriosferana (GIESE, BARBOSA, SILVA, 2003) 8
- Figura 2:** Modelo do sítio catalítico da lacase de *Trametes versicolor* composto por quatro átomos de cobre. Tipo 1 (T1) o cobre confere uma típica coloração azul a proteína, onde ocorre a oxidação do substrato. Tipo 2 (T2) e 3 (T3) os átomos de cobre formam um conjunto onde ocorre a redução do oxigênio molecular a água (RIVA, 2006). 12
- Figura 3:** Estrutura da lacase de *Trametes versicolor*. 13
- Figura 4:** Esquema do ciclo catalítico da lacase (DURÁN et al., 2002). 15
- Figura 5:** Esquema oxidação fenólica por lacase (MINUSSI; PASTORE; DURÁN, 2002). 16
- Figura 6:** Esquema indicando o efeito do mediador na catálise enzimática de uma lacase. 19
- Figura 7:** Fórmula estrutural do sal de diamônio de 2-2'-azine-bis(ácido 3-etilbixotiazolina-6-sulfônico), **ABTS**. 20
- Figura 8:** Diagrama representativo da oxidação do ABTS na presença de lacase (adaptado de MOROZOVA, et. al. 2007b). 21
- Figura 9:** Ilustração esquemática do método de automontagem via adsorção eletrostática, indicando as etapas de: 1) deposição do polycation, 2) lavagem e secagem do suporte contendo uma camada de polycation, 3) deposição do poliânion e 4) contendo camadas alternadas de polycation e poliânion (MATTOSO, PATERNO e OLIVEIRA JR, 2001). 28

**Figura 10:** Estrutura protonada da dopamina

31

**Figura 11:** Representação esquemática do processo de fabricação de filmes nanoestruturados por automontagem utilizando dois polieletrólitos, Lacase e PDDA. O substrato sólido foi imerso em solução (a) da enzima lacase carregada negativamente, durante um tempo de 5 minutos. Logo após, o mesmo substrato foi imerso em água (b) para remover o excesso e moléculas fracamente adsorvidas, completando a formação de uma camada (I). Em seguida, o substrato foi imerso em solução de PDDA (c), o policátion, por 5 minutos, e na seqüência, o excesso de moléculas é novamente removido em água (d). Após cada ciclo, completa-se a formação de uma bicamada (II).

42

**Figura 12:** Representação esquemática do processo de fabricação de filmes nanoestruturados por automontagem utilizando dois polieletrólitos, Lacase, polissacarídeo e PDDA. O substrato sólido foi imerso em solução (a) do policátion PDDA, durante 5 minutos. Logo após, o mesmo substrato foi imerso em água (b) para remover o excesso e moléculas fracamente adsorvidas, completando a formação de uma camada (I). Em seguida, o substrato foi imerso em solução de EPS (c), carregado negativamente, por 5 minutos, e na seqüência, o excesso de moléculas foi novamente removido em água (d). Uma nova camada de PDDA é depositada pela imersão do eletrodo na solução de PDDA (e) e lavado em água (f), formando a terceira camada (III). Por fim, a lacase foi depositada por atração eletrostática, imergindo o eletrodo na solução contendo lacase (g) e lavado em água na seqüência para eliminar o excesso de material não adsorvido. Após cada ciclo, completa-se a formação de uma tetracamada (IV).

43

**Figura 13:** Esquema representativo da rampa de potencial (E) em função do tempo para geração de um voltamograma cíclico. 46

**Figura 14:** Esquema do mecanismo de reação do radical ABTS com fenóis ou radicais fenoxilo e produtos secundários formados do ABTS (POTTHAST *et al.*, 1997) 49

**Figura 15:** Esquema indicando o efeito do mediador ABTS na catálise enzimática de uma lacase e conseqüente determinação de dopamina. 49

**Figura 16:** Perfil voltamétrico do eletrodo (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em: (—) solução de mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; e, (●●●) solução de dopamina  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , em ambos os casos o pH ajustado para 5,5.  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ . 50

**Figura 17:** Perfis voltamétricos do eletrodo (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5. Velocidade de varredura entre 2 e  $500 \text{ mV s}^{-1}$ . Representação da densidade de corrente de pico de oxidação ( $j_{P,OX}$ ) e respectivo potencial de pico de oxidação ( $EP,OX$ ) e a densidade de corrente de pico de redução ( $j_{P,RD}$ ) e o respectivo potencial de pico de redução ( $EP,RD$ ) 51

**Figura 18:** Raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v$ ) e a densidade de corrente dos picos ( $j_P$ ) de (■) oxidação e (○) redução para o eletrodo (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5. 53

**Figura 19:** Valores de  $\log(v)$  versus  $\log(j_p)$  para: (■) pico de oxidação ( $\theta = 0,342$  e  $R = 0,992$ ) e (○) pico de redução ( $\theta = 0,345$  e  $R = 0,989$ ). 54

**Figura 20:** Voltametrias cíclicas do filme (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em diferentes concentrações de dopamina (0,0; 2,0; 5,0; 10; 20; 30; 50 x 10<sup>-6</sup> M) com mediador ABTS 2,0 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup> com o pH ajustado para 5,5.  $v = 20$  mV s<sup>-1</sup>. 55

**Figura 21:** Curva analítica para o filme de (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em com mediador ABTS 2,0 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup> com o pH ajustado para 5,5; para voltamogramas obtidos em  $v = 20$  mV s<sup>-1</sup>. 55

**Figura 22:** Voltametrias cíclicas do filme (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo dopamina na concentração de 3,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> com mediador ABTS em diferentes concentrações ((—) 1,0; (- - -) 2,0; e, (• • •) 3,0 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) em valores de pH: (A) 7,0; (B) 5,0; e, (C) 3,0. 57

**Figura 23:** Picos de densidade de corrente (oxidação) em duas variáveis: [ABTS] e pH 58

**Figura 24:** Perfil voltamétrico do eletrodo (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em: (—) solução de mediador ABTS 2,0 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> utilizando como eletrólito suporte KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>; e, (••••) solução de dopamina 5,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, mediador ABTS 2,0 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> utilizando como eletrólito suporte KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, em ambos os casos o pH ajustado para 5,5.  $v = 20$  mV s<sup>-1</sup>. 60

**Figura 25:** Perfis voltamétricos do eletrodo (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em solução de dopamina 3,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, mediador ABTS 2,0 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup> com o

pH ajustado para 5,5. Velocidade de varredura entre 2 e 500  $\text{mV s}^{-1}$ . 61

**Figura 26:** Raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v$ ) e a densidade de corrente dos picos ( $j_p$ ) de oxidação e redução para o eletrodo

(PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5. 63

**Figura 27:** Valores de  $\log(v)$  versus  $\log(j_p)$  para: (■) pico de oxidação ( $\theta = 0,393$  e  $R = 0,999$ ) e (●) pico de redução ( $\theta = 0,450$  e  $R = 0,993$ ). 63

**Figura 28:** Voltametrias cíclicas do filme (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em diferentes concentrações de dopamina (0,0; 2,0; 5,0; 10; 20; 30;  $50 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) com mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5.  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ . 64

**Figura 29:** Curva analítica para o filme de (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em com mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5; para voltamogramas obtidos em  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ . 65

**Figura 30:** Voltametrias cíclicas do filme (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  contendo dopamina na concentração de  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  com mediador ABTS em diferentes concentrações ((—) 1,0; (- - -) 2,0; e, (• • •)  $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em valores de pH: (A) 7,0; (B) 5,0; e, (C) 3,0. 66

**Figura 31:** picos de corrente anódico em duas variáveis: [ABTS] e pH 67

## LISTA DE TABELAS

- Tabela I** Valores de densidade de corrente de pico ( $j_{P,OX}$ , oxidação e  $j_{P,RD}$ , redução) e dos potenciais de pico ( $E_{P,OX}$ , oxidação e  $E_{P,RD}$ , redução) para os perfis voltamétricos em diferentes velocidades de varredura do eletrodo (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5. 56
- Tabela II:** Experimentos realizados em três soluções diferentes condições: pH e concentração do mediador ABTS. 60
- Tabela III:** Valores de densidade de corrente de pico ( $j_{P,OX}$ , oxidação e  $j_{P,RD}$ , redução) e dos potenciais de pico ( $E_{P,OX}$ , oxidação e  $E_{P,RD}$ , redução) para os perfis voltamétricos em diferentes velocidades de varredura do eletrodo ((PDDA/EPSPDDA/LACASE)<sub>5</sub> em solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5. 66

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>4</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
3.1 FUNGO BOTRYOSPHAERI RHODINA	5
3.2 EXOPOLISSACARÍDEO	7
3.3 ENZIMA LACASE	9
3.4. MEDIADORES REDOX ENVOLVENDO LACASES	18
3.5 BIOSSENSORES	22
3.6 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA	24
3.7 FILMES AUTOMONTADOS: TÉCNICA “LAYER BY LAYER” (LBL)	27
3.8 DOPAMINA E SUA DETERMINAÇÃO	31
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
4.1 MATERIAL	34
4.1.1 REAGENTES	34
4.1.2 MICRORGANISMO: BOTRYOSPHAERIA RHODINA	34
4.2 MÉTODOS	35
4.2.1 MEIOS DE CULTIVO	35
4.2.1.1 MEIO MÍNIMO DE VOGEL (1956)	35
4.2.1.2 SOLUÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇOS	35

4.2.2 MANUTENÇÃO DO MICRORGANISMO	36
4.2.3 PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO (EPS)	36
4.2.4 PRODUÇÃO DA ENZIMA LACASE	38
4.2.5 CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR	40
4.2.6 MICROBALANÇA A CRISTAL DE QUARTZO	43
4.2.7 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA	44
4.2.7.1. VOLTAMETRIA CÍCLICA	44
<b>5. RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
5.1 MECANISMO DE DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA VIA CATALISE COM LACASE NA PRESENÇA DO MEDIADOR ABTS.	48
5.2 ELETRODO (PDDA/LACASE) <sub>5</sub>	50
5.3 ELETRODO (PDDA/EPS/PDDA/LACASE) <sub>5</sub>	59
5.4. EVIDÊNCIA DA FORMAÇÃO DOS FILMES DE (PDDA/EPS/PDDA/LACASE) <sub>5</sub> : RESULTADOS DA MICROBALANÇA DE QUARTZO	68
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>71</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico composto de um elemento biológico de reconhecimento intimamente em contato com um transdutor, ou seja, é um dispositivo que combina a especificidade de um elemento biológico ativo para o analito de interesse com a sensibilidade de um transdutor para converter o sinal proporcional a concentração do analito (ROSATTO, *et al.* 2001).

O emprego de biossensores eletroquímicos representa uma tendência crescente na química eletroanalítica moderna. Os biossensores representam uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas existentes para a determinação de compostos de interesse como os métodos cromatográficos e espectrofotométricos (WILKOLAZKA, RUZGAS, GORTON, 2004), devido as suas características únicas, tais como: especificidade, sensibilidade, seletividade, resposta rápida, baixo custo de produção, estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento “on site” rápido (AMINE *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, os biossensores modificados com tirosinase, lacase, peroxidase ou celobiose desidrogenase, tem sido desenvolvidos para a detecção de compostos fenólicos desde que este composto fenólico aja como doador de elétrons para estas enzimas (WILKOLAZKA, RUZGAS, GORTON, 2004). A enzima lacase é amplamente encontrada na natureza em fungos, plantas superiores e em algumas bactérias, utilizada nos processos de

despolimerização da lignina e na polimerização de compostos fenólicos (WILKOLAZKA, *et al.*, 2005).

Exopolissacarídeos (EPS) são gomas solúveis em água, definidos como polímeros extracelulares, produzidos por alguns fungos ou bactérias, encontrados ligados à superfície das células ou excretados para o meio extracelular, na forma de limo (SUTHERLAND, 1998). Particularmente, o fungo *Botryosphaeria rhodina* quando cultivado em meio com glucose como única fonte de carbono, produz EPS do tipo  $\beta$ -glucana, denominado de botriosferana, que é secretado no meio de cultivo, como uma maneira de estabilizar a enzima produzida pelo mesmo fungo (DEKKER; BARBOSA, 2001).

A dopamina é um neurotransmissor com funções essenciais para o sistema nervoso do ser humano, sendo sua detecção e monitoramento no sistema nervoso humano de uma importância para o entendimento de diversas doenças (WILSON e GIFFORD, 2005). Com o biossensor de lacase para dopamina, pode-se tanto inserir o dispositivo miniaturizado no corpo para uma medida “on line” e “on site”, como também realizar o teste no sangue após amostragem. A maior utilidade do dispositivo, no entanto, é de contribuir para desvendar como funciona a transmissão de impulsos nervosos. Pode ser usado também para monitorar tratamento de doenças neurológicas e na análise de componentes de produtos farmacêuticos que contenham a dopamina. Outro aspecto interessante é que esses tipos de exames, e outros que estão sendo desenvolvidos, podem ser agrupados em série, fornecendo em apenas uma bateria, e com o mesmo material, vários tipos de resultados simultâneos. É indicado para empresas farmacêuticas, laboratórios de análises

clínicas, fabricantes de equipamentos para análise com a vantagem de oferecer alta estabilidade, baixo custo e grande robustez.

Foram estudadas as propriedades eletroquímicas de compósitos envolvendo a lacase imobilizada no exopolissacarídeo botriosferana, frente à determinação de dopamina. Na primeira etapa, foi desenvolvido um eletrodo com a enzima imobilizada pela técnica de “*layer by layer*”(LBL) somente como policação. Um segundo método para a produção de um eletrodo modificado foi investigado, baseado em camadas automontadas constituídas pela alternância de camadas enzima lacase e exopolissarídeo, e o policação em questão, também pela técnica de “*layer by layer*” (LBL). A investigação gira em torno de se estabilizar a enzima com o exopolissacarídeo, conseguindo uma melhor resposta dos eletrodos.

## 2. OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver um biossensor com lacase imobilizada para detecção do neurotransmissor dopamina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produção de lacase pelo fungo *Botryosphaeria rhodina*.
- Produção de exopolissacarídeo pelo fungo *Botryosphaeria rhodina*.
- Imobilização da enzima lacase pela técnica de LBL em suporte rígido lâmina de FTO (Óxido de Estanho dopado com Flúor).
- Imobilização da enzima lacase e do exopolissacarídeo botriosferana pela técnica de LBL em suporte rígido lâmina de FTO (Óxido de Estanho dopado com Flúor).
- Analisar a resposta dos eletrodos quanto a determinação quantitativa de dopamina em solução.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 FUNGO BOTRYOSPHAERI RHODINA

Muitos microrganismos são encontrados na natureza como degradadores de matéria orgânica e possuem um importante papel na reciclagem de nutrientes para o meio ambiente. Estes microrganismos possuem enzimas específicas que os capacitam a degradar os componentes básicos da parede celular vegetal.

Os fungos são divididos em dois grupos: os que utilizam as substâncias de reserva presentes no lumen celular, conhecidos como fungos que causam bolor, ou que causam mancha, e os que possuem capacidade de degradar a parede celular utilizando enzimas específicas conhecidos como fungo da podridão branca, macia ou parda (SALDANHA 2006).

Os fungos filamentosos como os do gênero *Botryosphaeria*, são microrganismos fitopatogênicos capazes de degradar a lignina, são conhecidos por causar doenças em plantas de interesse comercial como árvores frutíferas, ornamentais e madeiras.

A decomposição da lignina é mais complexa por se tratar de um heteropolímero amorfo de elevado peso molecular, formado pela polimerização de unidades fenólicas e álcoois, que atua como material incrustante, conferindo rigidez às paredes celulares vegetais e resistência à degradação (SILVA; GOMES, 2004).

O *Botryosphaeria rhodina* têm sido estudado como produtor de lacases. Além destas enzimas estudos revelam seu potencial para a produção de pectinases e  $\beta$ -glucanases que também possuem aplicações biotecnológicas.

### 3.2 EXOPOLISSACARÍDEO

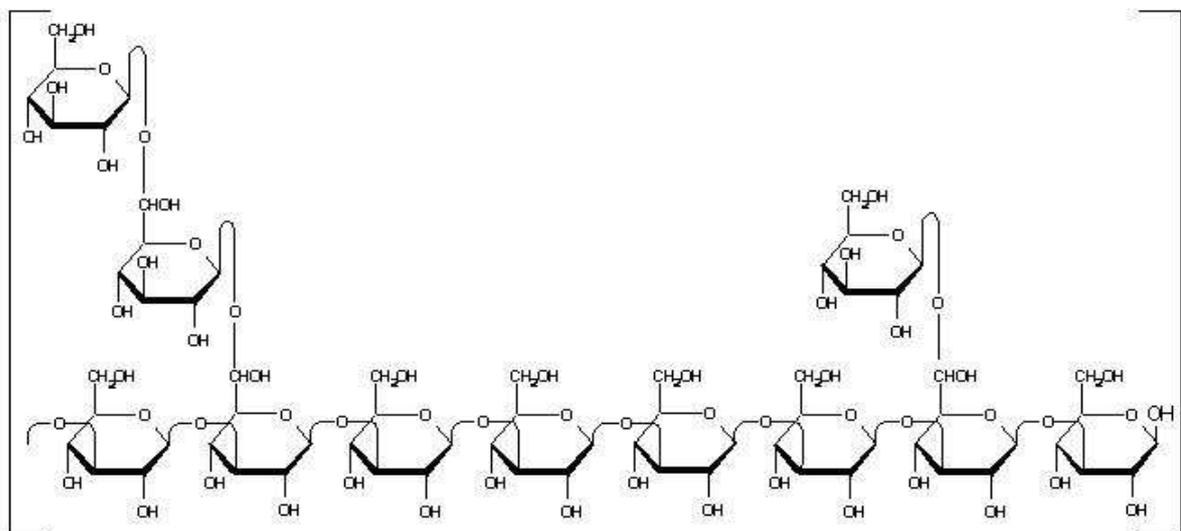
Os exopolissacarídeos (EPS) são gomas solúveis em água, definidos como polímeros extracelulares, produzidos por alguns fungos ou bactérias, encontrados ligados à superfície das células ou excretados para o meio extracelular, na forma de limo (SUTHERLAND, 1998). Algumas bactérias tem sido exploradas comercialmente para a produção de polissacarídeos aplicados nas indústrias alimentícias, cosméticos e produtos farmacêuticos, como a goma xantana, dextrana, curdilana, gelana, pululana, entre outras (BARBOSA, *et al.* 2003).

O interesse pela produção de EPS por microrganismos como substituinte de gomas derivadas de planta tem aumentado, a produção microbiana de EPS é independente de variações sazonais e, além disso, a recuperação e purificação não apresentam nenhum problema particular (SELBMANN; CROGNALE; PETRUCCIOLI, 2002).

O fungo *Botryosphaeria rhodina* quando cultivado em meio com glucose como única fonte de carbono, produz EPS do tipo  $\beta$ -glucana que é secretado no meio de cultivo (DECKER; BARBOSA, 2001).

A estrutura desta glucana foi caracterizada como (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucana com aproximadamente 22% de ramificação no C-6, constituído de ligações glicosídicas na cadeia principal, do tipo  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3). As ligações responsáveis pelas ramificações do polímero são do tipo  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6) que unem resíduos de glucose ou resíduos do dissacarídeo gentiobiose à cadeia

principal. Este polissacarídeo foi nomeado de botriosferana conforme mostra a Figura 1 (BARBOSA, *et al.* 2003).



**Figura 1:** Estrutura molecular da botriosferana (GIESE, BARBOSA, SILVA, 2003).

Técnicas de fermentação e biotecnologia têm sido desenvolvidas com o objetivo de sintetizar e modificar carboidratos, sendo baseadas essencialmente no uso de polissacarídeos. No entanto, há dificuldades em tornar alguns processos economicamente viáveis e também de se obter enzimas específicas para a conversão de determinados substratos (GIESE, BARBOSA, SILVA, 2003).

### 3.3 ENZIMA LACASE

As enzimas são macromoléculas predominantemente protéicas, imprescindíveis a qualquer ser vivo, pois aceleram as reações químicas que mantêm e regulam os processos vitais.

A grande maioria das enzimas aplicadas industrialmente, cerca de 75%, são hidrolases as quais despolimerizam substâncias naturais. Dentre as hidrolases as proteases dominam o mercado, sendo utilizadas em várias indústrias como as de detergentes, alimentos, couro e farmacêutica. O segundo grande grupo de hidrolases que encontra aplicação industrial é composto pelas carboidrases utilizadas principalmente na panificação, cervejarias, indústria de amido, têxteis e de papel. Além destes setores de aplicação tem sido crescente a utilização de enzimas na fabricação de ração animal, em biotransformação de produtos químicos, em análises diagnósticas, no tratamento de resíduos, etc (SAID, PIETRO, 2004).

O uso de enzimas pode melhorar os processos agro-industriais, reduzir custos energéticos associados ao processamento, melhorar a qualidade nutricional e a segurança dos alimentos, lançamento de novos produtos no mercado além de ser

uma alternativa para a utilização de diversas matérias primas (MINUSSI, PASTORE, DURÁN 2002).

A lacase é amplamente encontrada na natureza em fungos, plantas superiores e em algumas bactérias, utilizada nos processos de despolimerização da lignina e na polimerização de compostos fenólicos (WILKOLAZKA, *et al.*, 2005; ARAÚJO, *et al.* 2005). É encontrada em baixas concentrações em plantas e produzida por fungos filamentosos, principalmente, os da classe dos Basidiomicetos. Nos fungos, essa enzima é responsável pela pigmentação dos seus esporos, na deoxificação dos compostos fenólicos, sendo um catalisador chave na formação do corpo de frutificação e na classificação taxonômica dos Basidiomicetos.

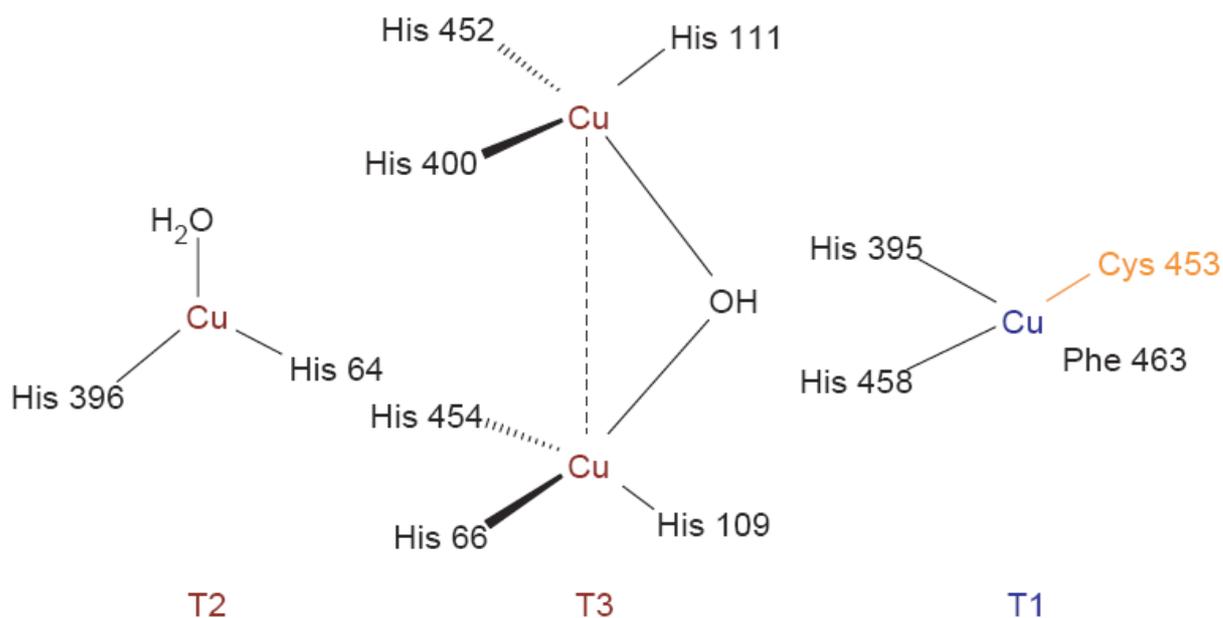
As lacases (EC: 1.10.3.2 *p*-difenol:oxigênio oxireductase) são polifenol oxidases que catalisam reações de oxido-redução de vários compostos aromáticos (fenóis e ácidos aromáticos), compostos não aromáticos, ligninas modificadas e ligninas *in natura* (LEONOWICZ *et al.*, 2001; DEKKER; BARBOSA; SARGENT, 2002; CLAUS, 2004) com concomitante redução do oxigênio molecular à água (YAROLOV *et al.*, 1994; THURSTON, 1994; GIANFREDA; XU; BOLAG, 1999; LEONOWICZ *et al.*, 2001; DURÁN *et al.*, 2002).

Esta cuproproteína também denominada de oxidases azuis é uma glicoproteína monomérica, dimérica ou tetramérica na sua forma ativa de holoenzima (KARAM; NICELL, 1997; CLAUS, 2004). Estes átomos de cobre conferem uma coloração azul típica à estas enzimas devido a intensa absorção eletrônica (PIONTEK, *et al.* 2002).

Em geral a lacase apresenta quatro átomos de cobre por monômero ligado a três sítios redox que desempenham um importante papel no mecanismo de catálise. Os átomos de cobre são distribuídos em diferentes sítios de ligação e são classificados em três tipos distintos dependendo do local de ligação do cobre com as seguintes metodologias: espectroscopia específica, ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e características funcionais (YAROPOLOV, *et al.* 1994; XU, 1996; MINUSSI *et al.*, 1999; DURÁN *et al.*, 2002). Podem ser Tipo 1 (T1) ou cobre azul, responsável pela intensa cor azul da enzima, com absorvância a 610nm, Tipo 2 (T2) ou cobre não azul pois exibe baixa absorvância na região do visível, e Tipo 3 (T3) ou sítio binucleado que apresenta dois átomos de cobre e é responsável por uma banda próxima a 330nm no espectro de absorvância da lacase nativa. Todos os íons

cobre estão aparentemente envolvidos no mecanismo catalítico (DURÁN et al., 2002; CLAUS, 2004).

As reações catalisadas pela lacase acontecem pela oxidação monoelétrica das moléculas do substrato que pode ser fenóis, aminas aromáticas ou alifáticas a seus radicais reativos correspondentes. O processo redox ocorre com a assistência de quatro átomos de cobre que forma o núcleo catalítico da enzima, conforme mostra a Figura 2 (RIVA, 2006).

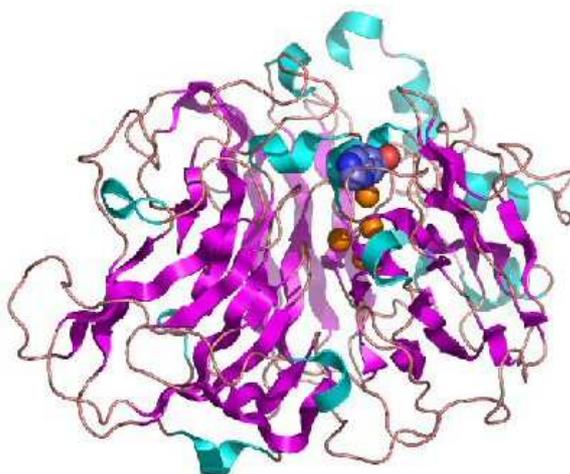


**Figura 2:** Modelo do sítio catalítico da lacase de *Trametes versicolor* composto por quatro átomos de cobre. Tipo 1 (T1) o cobre confere uma típica coloração azul a proteína, onde ocorre a oxidação do substrato. Tipo 2 (T2) e 3 (T3) os átomos de cobre formam um conjunto onde ocorre a redução do oxigênio molecular à água (RIVA, 2006).

Lacases produzidas por fungos isolados na natureza têm sido estudadas para utilização em diferentes processos

biotecnológicos de biorremediação de xenobióticos (WESENBERG, *et al.* 2003) na detecção e tratamento de poluentes fenólicos na forma de biossensores (ROSSATO *et al.*, 2001; FREIRE, *et al.* 2002; GOMES E REBELO, 2003; QUAN *et al.*, 2004).

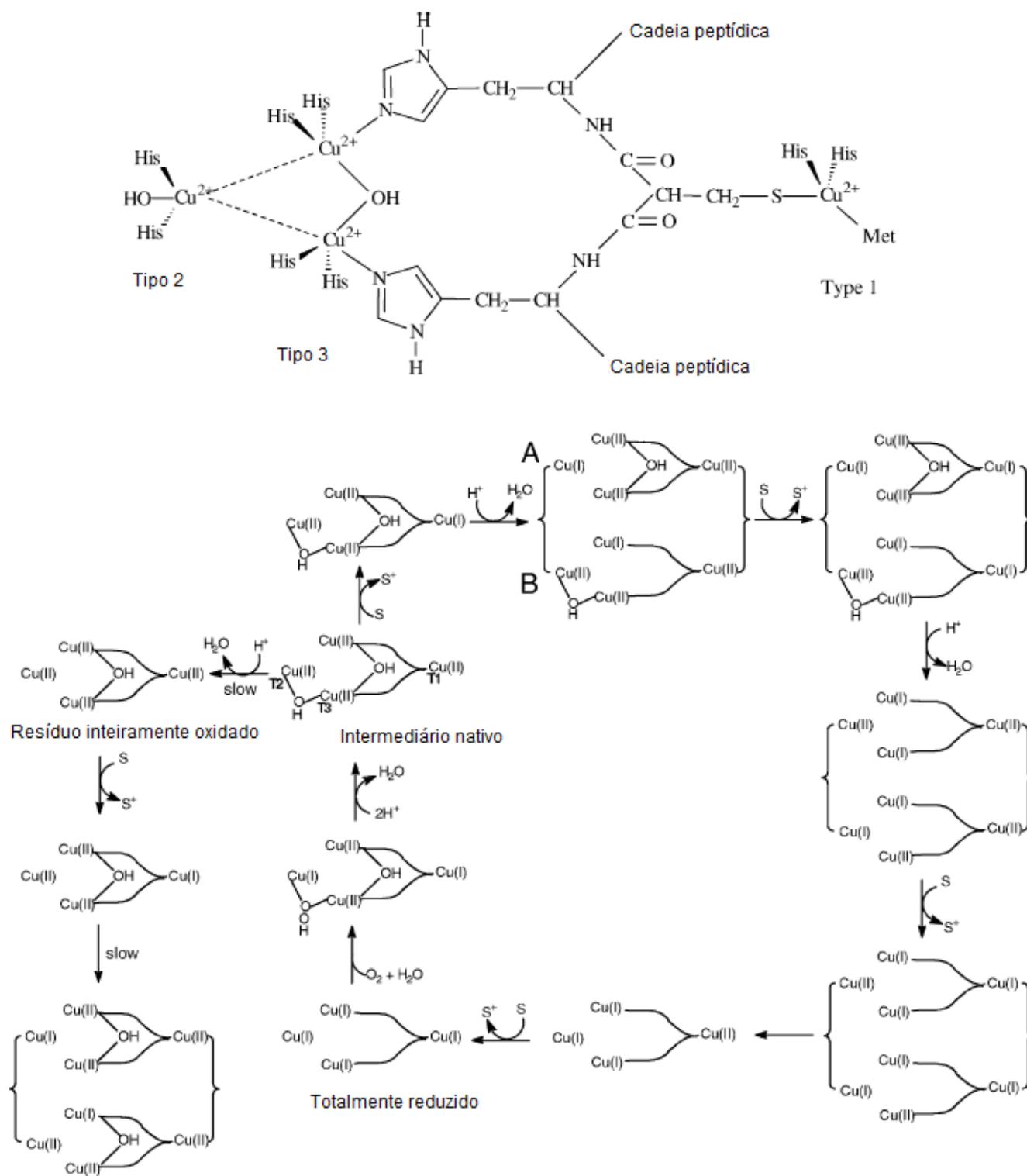
Segundo Duran *et al.* (2002) a estrutura da lacase do fungo *Trametes versicolor* foi determinada conforme mostra a Figura 3, sendo uma proteína globular com aproximadamente 500 aminoácidos.



**Figura 3:** Estrutura da lacase de *Trametes versicolor*. Fonte: Duran *et al.*; 2002.

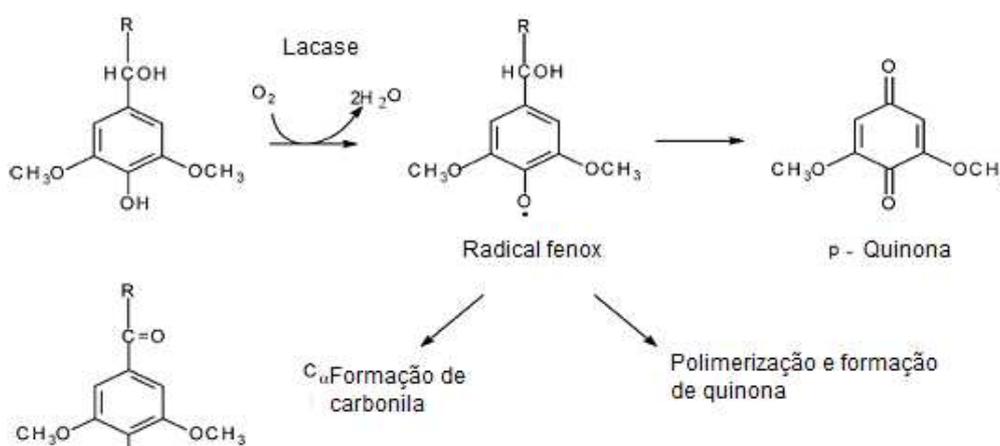
A Figura 4 ilustra o ciclo catalítico da lacase e os mecanismos propostos para redução e reoxidação do sítio cobre. Nesta figura (centro) começa do intermediário nativo (1), o substrato reduz o sítio Tipo 1 que transfere o elétron ao grupo trinuclear. Dois possíveis mecanismos para a redução do sítio trinuclear: (A) O Tipo 1 e Tipo 2 juntos reduzem o par Tipo 3; (B) cada átomo de cobre

do sítio trinuclear é reduzido seqüencialmente pela transferência de elétrons do tipo 1 sendo que o tipo 3 não age como acceptor de dois elétrons. A esquerda da figura mostra a decomposição do intermediário nativo que leva o suporte a forma inteiramente oxidada. Neste caso o sítio Tipo 1 pode ainda ser reduzido pelo substrato, mas a transferência de elétron do sítio trinuclear é demasiadamente lenta para ser cataliticamente relevante (DURÁN et al., 2002).



**Figura 4:** Esquema do ciclo catalítico da lacase (DURÁN et al., 2002).

Segundo Minussi; Pastore ; Durán (2002) uma reação típica de lacase é onde um fenol sofre a oxidação para formar radical livre. Com a atividade do oxigênio este radical pode ser transformado em quinona num segundo passo da oxidação. A quinona que é um produto do radical livre pode sofrer polimerização como demonstrado na Figura 5.



**Figura 5:** Esquema de oxidação fenólica por lacase (MINUSSI; PASTORE; DURÁN, 2002).

Vários biossensores contendo lacases imobilizadas têm sido desenvolvidos para a determinação de glucose, aminas aromáticas, compostos fenólicos, catecolaminas, entre outros (ROSSATO *et al.*, 2001; MINUSSI, PASTORE, DURÁN, 2002; LEITE *et al.*; 2003a, 2003b).

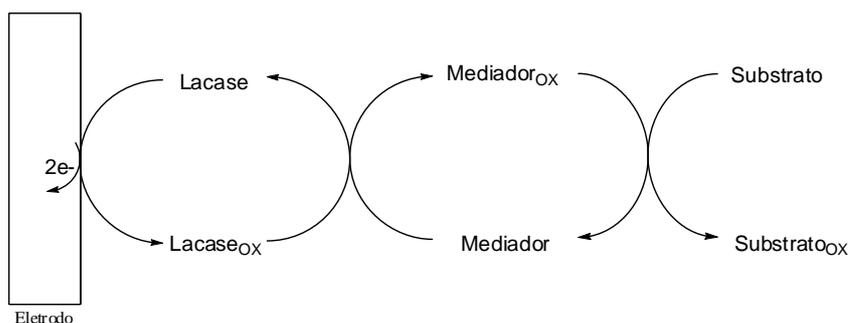
O fundamento desta aplicação é pertinente, pois muitos resíduos industriais possuem estruturas fenólicas e seus

derivados estão amplamente distribuídos na natureza, oriundos principalmente das atividades de produção de plásticos, tintas, corantes, drogas, antioxidantes, polímeros sintéticos, resinas, detergentes, desinfetantes, refinaria de óleo, papel e celulose. Alguns são altamente tóxicos sendo resultado da degradação de pesticidas organofosforados e fenoxiácidos clorados. Seus efeitos tóxicos causam danos ao meio ambiente e conseqüentemente ao ser humano, pois atuam como agentes carcinogênicos, mutagênicos, hepatotóxicos, além de afetarem as velocidades das reações biocatalíticas dos processos de respiração (ROSATTO *et al.*, 2001; GIANFREDA; RAO, 2004). Portanto tem sido proposto o desenvolvimento de tecnologias de remediação para acelerar a degradação destes compostos poluentes, utilizando principalmente microrganismos produtores de lacases, que modificam as propriedades toxicológicas destes contaminantes proporcionando biodegradação mais rápida e eficiente, além de sua utilização na tecnologia de alimentos que proporciona uma quantificação e identificação de compostos fenólicos que caracterizam a qualidade em sucos, bebidas e vinhos e conferem um melhor aproveitamento de polpas e cereais durante a extração de sucos e óleos.

### 3.4. MEDIADORES REDOX ENVOLVENDO LACASES

Em primeiro lugar, mediadores são considerados por converter substratos de baixo peso molecular, cuja oxidação enzimática dá lugar a intermediários estáveis com alto potencial. Os substratos assim participam de uma reação química (não enzimática) com outros compostos, pouco ou não oxidáveis pela lacase, seguindo uma cinética controlada por difusão. O mediador oxidado é reduzido a forma inicial pelo composto a ser oxidado (BOURBONNAIS, *et.al.* 1998; FABBRINI, *et.al.* 2002), fechando o ciclo, como mostra a Figura 6.

Desde de 1990, quando o sal de diamônio de 2-2'-azine-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), ABTS (do inglês: "*diammonium de 2-2'-azine-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*"), foi encontrado como um mediador para substrato ou ativador da catálise enzimática (BOURBONNAIS e PAICE, 1990) o número de compostos que podem ser convertidos pela lacase aumentaram drasticamente. Um mediador redox ideal deve ser um bom substrato para a lacase; as formas reduzida e oxidada devem ser estáveis e não devem inibir a reação enzimática, a conversão redox deve ser cíclica (JOHANNES e MAJCHERCZYK, 2000).



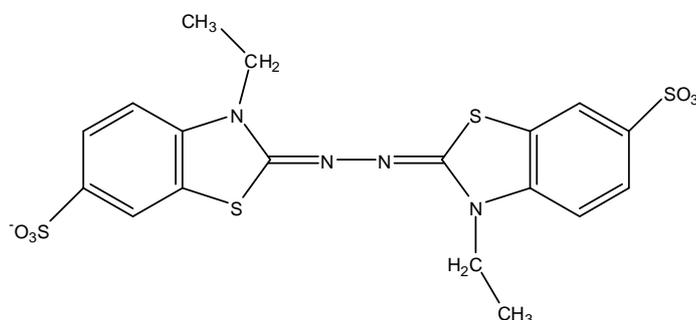
**Figura 6:** Esquema indicando o efeito do mediador na catálise enzimática de uma lacase.

Idealmente, sem participar de reações paralelas, um mediador redox pode realizar muitos ciclos sem haver qualquer degradação. O mediador oxidado, produzido no curso da reação enzimática pode oxidar, não enzimaticamente, compostos incluindo qualquer classe destes com potenciais de ionização excedendo o potencial da lacase. Entretanto, o mecanismo destes processos é insuficientemente entendido em muitos casos. A diferença entre o potencial redox do substrato a ser oxidado e o cobre na posição T1 é a força motriz da reação. Porém, em relação a termodinâmica do processo, o fator cinético deve ser levado em consideração, nos casos que compostos com potenciais redox próximos dos da lacase não funcionam especificamente como substratos para esta enzima.

Verdadeiros mediadores redox incluem um número limitado de compostos, que, antes de tudo, encontram o requerimento de realizar múltiplos ciclos reacionais no processo redox de interesse. Encaixam-se nessa condição diversos complexos de metais de transição (octocianomolibdato ou octocianotungstanato de potássio), complexos de ferro (o-fenantrolina e 4,4'-dimetilbipiridina de Ferro II), bem como alguns compostos orgânicos como ABTS e 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil (TMPO). Estes componentes têm

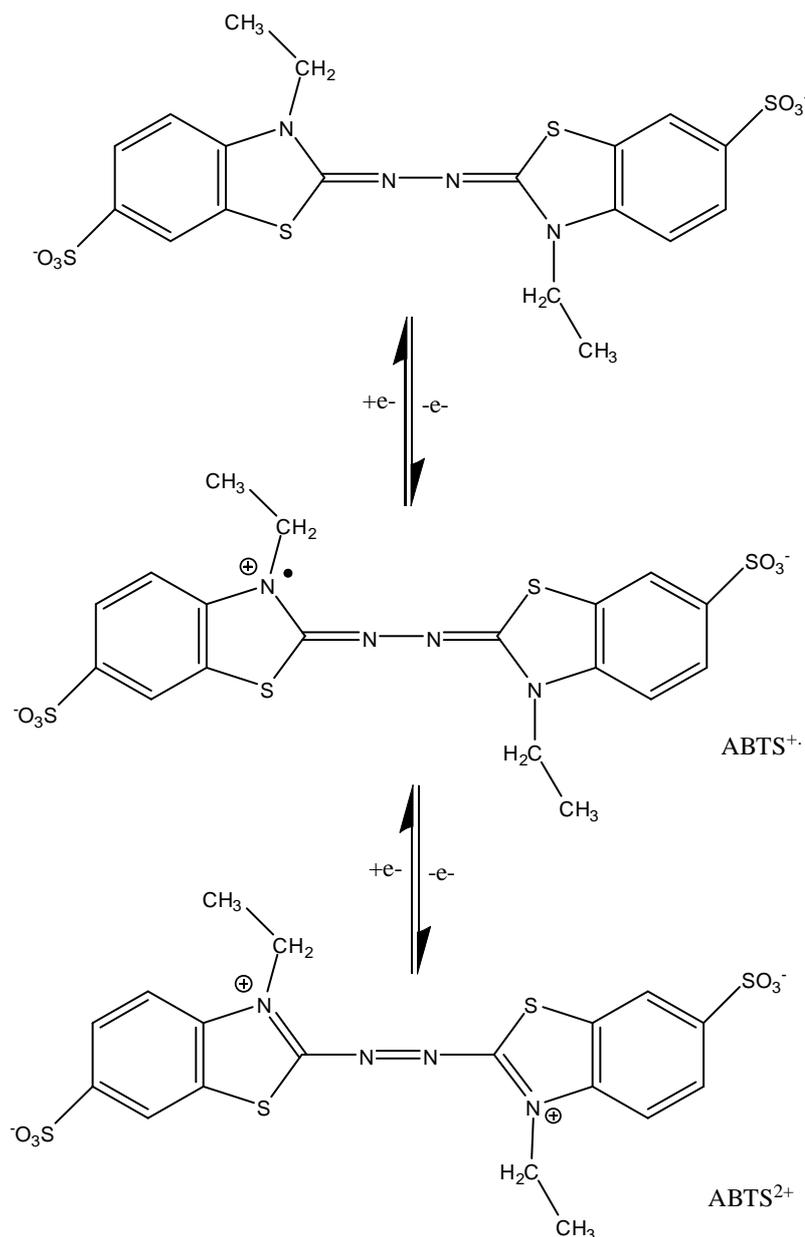
potenciais redox relativamente elevados e realizam diversos ciclos catalíticos sem sofrer quaisquer tipos de alterações/degradações. Em contrapartida, muitas vezes são inviabilizados de uso em larga escala devido ao alto preço e problemas com segurança ambiental.

O composto orgânico que melhor se encaixa neste termo como “mediador redox” é o ABTS, cuja fórmula estrutural está representada na Figura 7.



**Figura 7:** Fórmula estrutural do sal de diamônio de 2-2'-azine-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), ABTS.

Formalmente, foi pensado que somente o cátion ABTS radicalar, formado durante a oxidação enzimática, poderia oxidar compostos não fenólicos, tais como, determinadas estruturas lignolíticas. Entretanto, estudos mais recentes, preferencialmente eletroquímicos e espectrofotométricos, mostraram que o processo pode envolver outros mecanismos, demonstrando que a oxidação mediada pelo ABTS pela lacase ocorria em dois estágios (BOURBONNAIS, *et.al.* 1998; FABBRINI, *et.al.* 2002). O primeiro estágio, bastante rápido, há a formação do cátion radicalar ABTS<sup>•+</sup>, seguido por uma oxidação lenta do cátion radicalar ao dicátion ABTS<sup>2+</sup>, como representado pela Figura 8.



**Figura 8:** Diagrama representativo da oxidação do ABTS na presença de lacase (adaptado de MOROZOVA, *et. al.* 2007b).

É conhecido que a oxidação eletroquímica do ABTS produz sequencialmente o cátion radicalar ABTS<sup>•+</sup> e o dicátion ABTS<sup>2+</sup>, como no caso da catálise enzimática. Estudos envolvendo voltametria cíclica mostraram que os estados redox para ABTS são estáveis e reversíveis, tendo potenciais redox padrões de 0,472 V para o par ABTS/ABTS<sup>•+</sup> e 0,885 V para o par redox

ABTS<sup>+•</sup>/ABTS<sup>2+</sup> em relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl (BOURBONNAIS, *et. al.* 1998).

### 3.5 BIOSSENSORES

Nos últimos anos o desenvolvimento de biossensores tem atraído grande interesse devido a sua aplicação em grande número de procedimentos analíticos e como sensores específicos que permitem a monitoração e o controle de processos bioquímicos (VALDMAN et al., 1993).

Um biossensor consiste de materiais biológicos, tais como: enzimas, organelas, tecido animal e vegetal, microrganismo, antígeno ou anticorpo, ácidos nucleicos, entre outros, imobilizado em suporte, conectado a um sensor base (transdutor) que converte o sinal biológico em elétrico. De acordo com o transdutor utilizado, o biossensor pode ser classificado como eletroquímico (potenciométrico, amperométrico e condutimétrico), óptico (medida da luminescência, fluorescência etc.), detector de massa (relaciona a oscilação da frequência dos cristais piezelétricos com variação da massa). Conforme o tipo de interação que ocorre entre a substância a ser determinada e o material biológico, o biossensor é classificado como catalítico ou de afinidade.

Entre os biossensores eletroquímicos, os amperométricos e potenciométricos são os mais utilizados. Os

amperométricos baseiam-se nas medidas da intensidade de corrente em uma célula eletroquímica a um potencial fixo, sendo a corrente gerada por reação de oxidação ou redução eletroquímica de espécies eletroativas na superfície sensível, proporcional à concentração de analito (STRADIOTTO, YAMANAKA, ZANONI, 2003; VARGA, LO GORTON, RUZGAS, 1995). Nessa técnica, usualmente o potencial do eletrodo de trabalho (biossensor) é mantido constante em relação ao eletrodo de referência (ex. Ag/AgCl, Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). A corrente resultante medida é correlacionada com a oxi-redução do produto da reação enzimática.

Nas medidas potenciométricas, a magnitude do potencial medido é decorrente da diferença de potencial entre um eletrodo indicador (biossensor) e um eletrodo de referência. A diferença de potencial é entre o eletrodo indicador e o de referência é proporcional ao logaritmo da atividade do íon ou da concentração deste analito (ROVER, OLIVEIRA NETO, KUBOTA, 1997).

Uma das etapas mais importantes para a construção de um biossensor é a escolha da enzima, pois reage seletivamente com o analito.

### 3.6 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

Uma das maiores dificuldades na construção de biossensores enzimáticos está relacionada com a estabilidade da molécula biológica. Fora do seu ambiente bioquímico, a proteína, da qual a enzima faz parte, tende, naturalmente a se desnaturar, perdendo seu poder catalítico. Assim a atividade enzimática diminui com o tempo, diminuindo o desempenho do biossensor.

Esta dificuldade pode ser diminuída pela imobilização adequada da molécula de proteína, o que diminui a velocidade de desnaturação da enzima. A imobilização da enzima é um passo muito importante na construção do biossensor, pois a utilização de materiais imobilizados além de diminuir o custo por análise aumenta a exatidão e rapidez do processo (DURÁN *et al*, 2002).

Dentre os métodos de imobilização os mais utilizados na construção de biossensores tem sido (DURÁN *et al*, 2002; FREIRE, DURÁN, KUBOTA, 2001):

*Ligação covalente*: este tipo de imobilização é realizada por ligações de grupos funcionais não ativos da enzima (não essencial para sua atividade catalítica) a grupos reativos (hidroxila, carboxila, amina,

fenólico, imidazóico, tiol) ligados na superfície sólida do suporte insolúvel.

*Ligação covalente cruzada:* esta imobilização baseia-se também na formação de ligações químicas, porém na ausência de suporte. Reagentes bi ou multifuncionais (glutaraldeído, 2-isocianato-4-isotiocianato tolueno, 2,4, biscloroeto sulfonil fenol, etc.) são empregados tanto para imobilização quanto para a estabilização da enzima. O método baseia-se na formação de partículas microscópicas (ou rede polimérica) em decorrência de ligações covalentes cruzadas, entre moléculas de enzimas e/ou moléculas do suporte com reagentes funcionais.

*Oclusão em gel ou filme polimérico:* este método consiste no confinamento da enzima nos espaços intersticiais de polímeros (Ágar, poliacrilamida, álcool polivinílico). Uma solução de enzima a ser ocluída é misturada com uma solução de monômeros e um catalisador para polimerização. As enzimas podem ser ocluídas em poliacrilamida, agarose, alginato de cálcio, entre outros. Uma desvantagem desta técnica é o tamanho irregular dos poros, falta de rigidez e limitações disfuncionais para substrato e produto. Outra técnica de imobilização de enzimas é pelo uso de filmes poliméricos preparados eletronicamente. Estes filmes são obtidos por

polimerização eletroquímica de compostos orgânicos aromáticos tais como pirrol, tiofeno, fenilendiimida, fenol, etc., e a imobilização por deposição do filme polimérico sobre a superfície de um eletrodo sobre a qual a enzima tenha sido previamente imobilizada (por adsorção, ligação cruzada, etc.).

*Adsorção física:* é um dos processos de imobilização mais simples, envolve a adsorção de enzimas em suportes insolúveis que resulta geralmente em interações do tipo iônica, polar, pontes de hidrogênio ou hidrofóbicas. Esses suportes geralmente possuem superfície ativa e funcionam como excelentes adsorventes e incluem a alumina, resinas de troca iônica, bentonita, grafite, vidro, etc.. Como desvantagem o material biológico adsorvido é extremamente dependente dos fatores como pH, solvente, temperatura, etc.

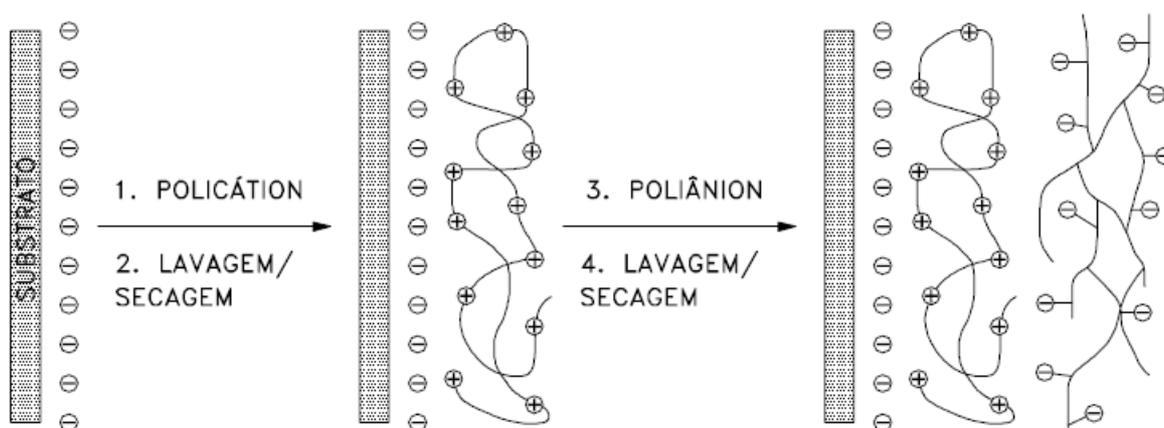
### 3.7 FILMES AUTOMONTADOS: TÉCNICA “LAYER BY LAYER” (LBL)

Métodos de fabricação de filmes finos de diferentes materiais, que permitem controle de espessura e de propriedades em nível molecular, têm recebido enorme atenção e importância entre as tecnologias modernas (DECHER 1997).

Entre as diferentes técnicas desenvolvidas recentemente para fabricação de filmes finos está a técnica de automontagem (do inglês *Self-Assembly*), também conhecida como camada por camada – LBL (do inglês *Layer-by-Layer*) esta técnica tem se mostrado extremamente promissora, capaz de produzir filmes ultrafinos organizados em nível nanométrico de diferentes tipos de materiais de interesse, de maneira simples e barata (MATTOSO; MEDEIROS e PATERNO, 2006).

A técnica de automontagem LBL foi proposta pela primeira vez no início da década de 1980, no trabalho pioneiro de Sagiv (1980) e anos mais tarde, reformulada por Decher e Hong (1991). Esta técnica recebe este nome pois consiste da adsorção espontânea, química ou física de camadas ultrafinas (10 – 100 Å) de materiais sobre a superfície de um suporte sólido, a partir de

suas soluções. O tipo de adsorção depende da afinidade entre o suporte e o material, o que está diretamente relacionado com a estrutura química dos materiais empregados (MATTOSO, MEDEIROS e PATERNO, 2006).



**Figura 9:** Ilustração esquemática do método de automontagem via adsorção eletrostática, indicando as etapas de: 1) deposição do policação, 2) lavagem e secagem do suporte contendo uma camada de policação, 3) deposição do poliânion e 4) contendo camadas alternadas de policação e poliânion (MATTOSO, PATERNO e OLIVEIRA JR, 2001).

O método de automontagem proposto por Decher e Hong (1991), baseia-se na interação eletrostática entre moléculas contendo grupos iônicos. Este método ilustrado pela Figura 9 consiste basicamente na imersão de um substrato sólido, previamente tratado, por um breve período de tempo numa solução aquosa contendo, por exemplo, um sal da substância a ser depositada. A carga desta substância deve ser contrária à do substrato para que ocorra adsorção por atração eletrostática.

Posteriormente, o conjunto é lavado, a fim de eliminar o excesso de material, seco e então imerso numa solução contendo outro sal, agora de carga contrária à do sal inicialmente depositado, de maneira a resultar numa espécie de “sanduiche” formado por camadas moleculares catiônicas e aniônicas, alternadamente adsorvidas. A repetição deste processo leva à formação de filmes ultrafinos com multicamadas. Uma das vantagens oferecidas por este método refere-se ao solvente, comumente utilizado, água, embora esta característica também limite a gama de polímeros empregados (MATTOSO, PATERNO e OLIVEIRA JR, 2001).

Decher e Hong (1991) verificaram que este método permite controle da espessura do filme através de medidas de espectroscopia de UV-Visível. Constataram um aumento linear da absorvância do filme formado, à medida que cada camada era depositada, uma vez que, sendo a absorvância proporcional à quantidade de material absorvente, cada camada depositada contribuiu com aproximadamente uma mesma quantidade de material.

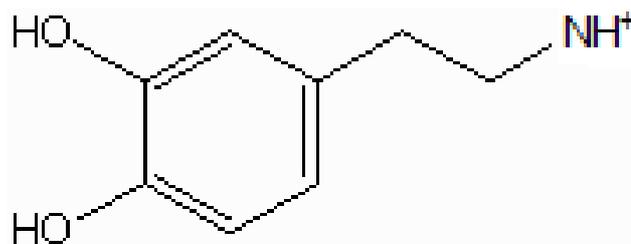
Contudo, o processo de automontagem não depende só da presença de cargas nas moléculas adsorventes. Alguns trabalhos (STOCKON e RUBNER, 1997; LVOV *et al.*, 1996)

revelam que outros tipos de interação, diferentes da atração eletrostática, podem predominar no processo de automontagem, a proximidade das moléculas envolvidas contribui com outros tipos de forças de interação, como forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, forças dispersivas ou de London, cujas intensidades tornam as monocamadas compactadas e fortemente adsorvidas (ULMAN, 1991). Polímeros condutores como a polianilina e seus derivados encontram-se no estado carregado (dopados) quando em soluções de baixo pH (MaCDIARMID *et al.*, 1987). Verificou-se entretanto que estes polímeros podem ser automontados a partir de soluções em pHs elevados, ou seja, como se fossem polímeros neutros (STOCKON e RUBNER, 1997; PONTES *et al.*, 1999). Neste caso, o processo de automontagem é governado por interações não iônicas, como ligações de hidrogênio. Foi verificado que a quantidade de polianilina adsorvida num filme automontado é maior quando camadas desta são alternadas com camadas de polímeros que têm facilidade de fazer ligações de hidrogênio (STOCKON e RUBNER, 1997). Isto se deve ao fato de as cadeias de polianilina não dopadas assumirem uma conformação mais enovelada, até mesmo formando agregados na solução (ZHENG *et al.*, 1997), ocupando menos espaço no substrato e facilitando a aproximação e acomodação de mais polímero. Portanto o método

de automontagem LBL proposto por Decher, pode ser utilizado por uma grande variedade de materiais devido ao baixo custo de produção e um grande potencial tecnológico (MATTOSO, PATERNO e OLIVEIRA JR, 2001).

### 3.8 DOPAMINA E SUA DETERMINAÇÃO

Dopamina é um neurotransmissor central, precursor metabólico da noradrenalina e da adrenalina, que atua em receptores específicos, presentes no sistema nervoso central, nos vasos mesentéricos, renais e nas coronárias cuja estrutura é mostrada na figura 10. É utilizada para o tratamento de diversos tipos de choque e da hipotensão grave após infarto agudo do miocárdio, dilatando os vasos sanguíneos renais e aumentando dessa forma o fluxo de sangue (WILSON e GIFFORD, 2005).



**Figura 10:** Estrutura protonada da dopamina

Diversas metodologias podem ser encontradas na literatura para determinação desse analito (WILSON e GIFFORD, 2005), dentre estas destacam-se os procedimentos em fluxo com

detecção espectrofotométrica (ORTEGA, DOMINGUEZ, 1996; NEVADO, *et al.* 1995; NEVADO *et al.* 1996), amperométrica (MONTENEGRO e SALES, 2000) e por quimiluminescência (NOZAKI, *et al.* 1999). Ortega e Dominguez (1996) empregaram tirosinase imobilizada em reatores para determinação de dopamina por análise em fluxo com detecção espectrofotométrica e eletroquímica, apresentando limites de detecção de  $3,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e  $8,4 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Nevado e colaboradores empregaram solução de metaperiodato em fluxo para detecção espectrofotométrica dessa catecolamina. O sistema apresentou um limite de detecção de  $2,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e uma frequência de amostragem de 130 determinações por hora. Montenegro e Sales (2000) empregaram um eletrodo seletivo de  $\text{IO}_4^-$  para a determinação potenciométrica de dopamina, obtendo-se linearidade no intervalo de concentração desse analito de  $8,0 \times 10^{-3}$  a  $2,7 \times 10^{-1}$  g L<sup>-1</sup> ( $4,2 \times 10^{-5}$  a  $1,4 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). Lima e colaboradores (1998) desenvolveram eletrodos de carbono vítreo e pasta de carbono modificados com tecido vegetal de palmeira (*Latania* sp), como fonte enzimática para a determinação eletroquímica dessa catecolamina. O sistema em fluxo apresentou linearidade entre  $5,0 \times 10^{-6}$  a  $7,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de dopamina. Wang e Walcarius (1996) construíram eletrodos de pasta de carbono modificados com

zeólitas para a determinação amperométrica desse fármaco. O sistema apresentou linearidade entre  $2,0 \times 10^{-5}$  a  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> com um tempo de residência de 45 s para pré-concentração em fluxo. Nozaki e colaboradores (1999) determinaram dopamina por meio da geração de peróxido de hidrogênio durante 30 min e detecção quimiluminescente do mesmo, na reação com peroxidase e luminol. O limite de detecção obtido foi de  $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, com um desvio padrão relativo de 4,7% (n=5).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAL**

#### **4.1.1 REAGENTES**

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica (PA) e foram usados sem purificação prévia. A água para o preparo das soluções e a água de lavagem dos eletrodos foi deionizada e ultrapura por um sistema Mili-Q<sup>®</sup>.

#### **4.1.2 MICRORGANISMO: BOTRYOSPHAERIA RHODINA**

O fungo produtor de exopolissacarídeo e enzima lacase em estudo foi o ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* isolado de cancro de eucalipto por Barbosa, Dekker e St Hardy (1996).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 MEIOS DE CULTIVO

#### 4.2.1.1 MEIO MÍNIMO DE VOGEL (1956)

O meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956) foi preparado pela diluição dos seguintes reagentes:

✓	Na <sub>3</sub> citrato 5H <sub>2</sub> O	150 g;
✓	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anidro	250 g;
✓	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> anidro	100 g;
✓	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	10 g;
✓	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	5 g;
✓	Solução Elementos Traços	5 mL;
✓	Solução Biotina	2,5 mL.

O volume final foi acertado para 1 litro. Para ser usado, este meio foi diluído 50 vezes em água destilada. O pH foi corrigido para 5,8 com ácido fosfórico ou sulfato de amônia.

#### 4.2.1.2 SOLUÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇOS

A solução foi preparada pela diluição dos seguintes reagentes:

✓	Ácido cítrico 1H <sub>2</sub> O	5 g;
✓	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	5 g;
✓	Fe (NH <sub>4</sub> )(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	1 g;
✓	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,25 g;
✓	MnSO <sub>4</sub> 1H <sub>2</sub> O	0,25 g;

✓	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> anidro	0,05 g;
✓	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,05 g.

O volume final da solução de elementos traços foi completado para 100 mL. A solução de biotina foi preparada dissolvendo-se 5 mg de biotina (Merck) em 50 mL de água destilada.

#### 4.2.2 MANUTENÇÃO DO MICRORGANISMO

O fungo *Botryosphaeria rhodina* foi mantido em meio BDA (batata-dextrose-ágar) inclinado, a 4°C, com repiques trimestrais.

#### 4.2.3 PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO (EPS)

O exopolissacarídeo Botriosferana foi produzido através do cultivo do fungo *Botryosphaeria rhodina* em meio líquido, de acordo com os seguintes passos:

*Ativação das células:* para o preparo do pré inóculo, o fungo foi transferido para o meio sólido contendo meio mínimo de Vogel (1/50) (VOGEL, 1956), ágar 2% (m/v) e glucose a 1% (m/v) como fonte de carbono. As placas de Petri foram incubadas durante 5 dias a 28 ± 2°C em estufa bacteriológica.

*Pré inóculo:* pequenas porções de hifas foram transferidas com uma alça de metal para frascos de Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio mínimo de Vogel (2% v/v), com 0,5% (m/v) de glucose. Os cultivos foram mantidos sob agitação a 180 rpm a 28°C por 48 horas.

*Inóculo:* após o crescimento, os micélios foram transferidos assepticamente para um homogeneizador previamente esterilizado e homogeneizado a velocidade máxima por 30 segundos. O homogeneizado foi centrifugado por 10 minutos a 7000 x g, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos em uma solução de salina fisiológica estéril. Em seguida a referida solução foi diluída até se obter um valor de absorvância entre 0,4 e 0,5 em 400 nm. Encontrado a exata diluição, os precipitados diluídos foram inoculados em frascos de Erlenmeyer (2000 mL) contendo 400 mL de meio mínimo de Vogel (1956) (1/50), glucose 5% (m/v). Cada frasco foi inoculado com 16 mL de solução do homogeinato de células e incubados sob agitação constante de 180 rpm a 28°C por 72 horas.

*Interrupção dos cultivos:* os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 7000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dialisado com água deionizada em papel celofane

por 48 horas, trocando a água pelo menos 2 vezes ao dia sob refrigeração.

*Precipitação do EPS:* foi medido o volume final dos saquinhos de diálise e precipitado o EPS com um volume três vezes maior de álcool anidro 100% sob refrigeração durante uma noite. Os precipitados foram dialisados exaustivamente com água deionizada em papel celofane sob refrigeração.

*Ressolubilização e liofilização do EPS:* o EPS dialisado foi resolubilizado com água deionizada e baixo aquecimento (35°C) para não causar modificações estruturais na molécula. Em seguida o EPS foi congelado e liofilizado.

Os EPS foram produzidos no Laboratório de Pesquisa de Bioquímica de Microrganismo do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, sob orientação da Professora Dra. Aneli de Melo Barbosa.

#### **4.2.4 PRODUÇÃO DA ENZIMA LACASE**

A enzima lacase foi produzida através do cultivo do fungo *Botryosphaeria rhodina* em meio líquido, de acordo com os seguintes passos:

*Ativação das células:* para o preparo do pré inóculo, o fungo foi transferido para o meio sólido contendo meio mínimo de Vogel (1/50) (VOGEL, 1956), ágar 2% (m/v) e glucose a 1% (m/v) como fonte de carbono. As placas de Petri foram incubadas durante 5 dias a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  em estufa bacteriológica.

*Cultivo em meio líquido:* os cultivos foram desenvolvidos incubando 64 esferas de 0,7 mm das placas de Petri crescidas com *Botryosphaeria rhodina* em frascos de Erlenmeyer (2000 mL) contendo 400 mL de meio mínimo de Vogel (1956) (1/50), glucose 1% (p/v) e álcool veratrílico (álcool 3,4 dimethoxibenzílico) na concentração de 30,4 mM, incubados a  $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  numa rotação de 180 rpm por 4,5 dias.

*Interrupção dos cultivos:* os cultivos foram interrompidos através de centrifugação a  $14000 \times g$  à  $4^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em lã de vidro e coletados em banho de gelo e utilizados na determinação da atividade da lacase.

*Determinação da atividade da lacase:* a atividade da lacase foi determinada conforme descrito por Barbosa et al., (1996), utilizando como substrato o ABTS (2,2- azino- bis (3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid). O volume final do ensaio

enzimático foi de 1 mL e o sistema de incubação continha 50 µL de ABTS (50 mM em água deionizada), 150 µL de tampão McIlvaine (pH 3,0 – 120 mM), solução enzimática (0,1 a 0,8 mL) e água deionizada para completar o volume (se necessário), com a leitura de absorvância até no máximo 0,6. Este ensaio foi então incubado por 5 minutos em banho-maria termostaticado à 50°C. As leituras foram desenvolvidas à 420 nm ( $\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A unidade de atividade da lacase foi definida como o número de µmoles de ABTS oxidados por minuto por mL de extrato enzimático nas condições de ensaio descritas.

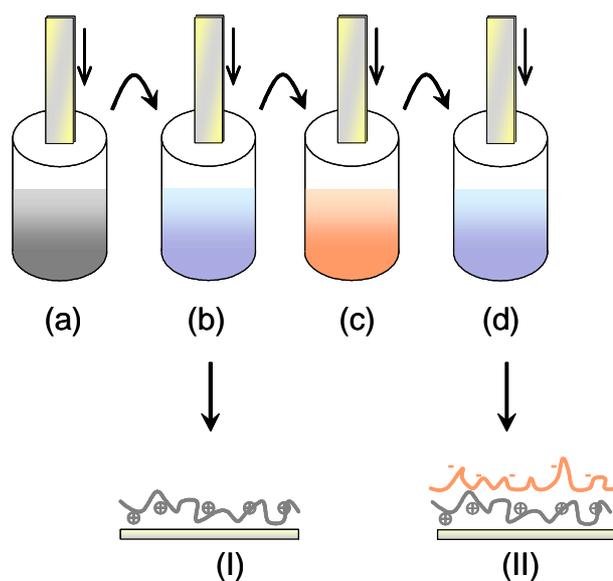
A enzima lacase foi produzida no Laboratório de Pesquisa de Bioquímica de Microrganismo do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, sob co-orientação da Professora Dra. Aneli de Melo Barbosa.

#### **4.2.5 CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR**

Foram construídos dois eletrodos com configurações diferentes, sendo que ambos foram montados pela técnica “Layer-by-Layer”. O filme pôde ser montado em camadas respeitando as atrações eletrostáticas entre os compostos. O material sólido de suporte utilizado foi uma lâmina de FTO (Óxido de Estanho dopado

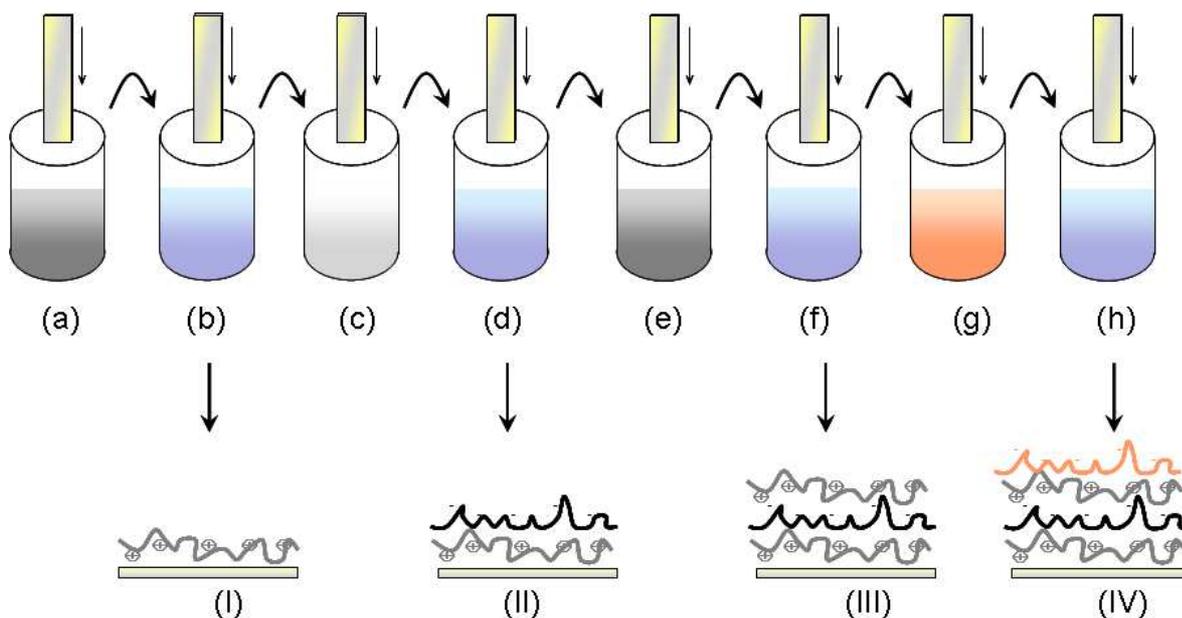
com Flúor, Flexitec, resistência  $< 5 \Omega/\text{cm}^2$ ), devidamente limpa em solução  $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2$  na proporção 3:1:1. A partir de dados na literatura, a enzima utilizada apresenta ponto isoelétrico em aproximadamente 4,5, assim esta apresentará carga negativa em pH 5,5. Acredita-se que neste valor de pH o EPS apresente carga negativa. Em contra partida, o polieletrólito PDDA (*poly(diallyldimethylammonium chloride)*) neste pH de trabalho se comporta como um policátion.

O primeiro eletrodo a ser discutido neste trabalho será aquele composto por cinco bicamadas de PDDA/LACASE ( $\text{PDDA/LACASE}$ )<sub>5</sub>. Neste caso a lâmina de FTO foi inicialmente submersa em uma solução de PDDA  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , com o pH ajustado para 5,5, ficando nesta solução por dez minutos, então foi lavada em água deionizada ultrapura, em seguida foi submersa em uma solução de lacase  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  com pH também ajustado para 5,5, ficando nesta solução por quinze minutos, então foi lavada, e a lâmina com a primeira bicamada foi seca. A metodologia foi repetida por mais quatro vezes, obtendo assim um filme de 5 bicamadas, Figura 11.



**Figura 11:** Representação esquemática do processo de fabricação de filmes nanoestruturados por automontagem utilizando dois polieletrólitos, Lacase e PDDA. O substrato sólido foi imerso em solução (a) da enzima lacase. Logo após, o mesmo substrato foi imerso em água (b) para remover o excesso e moléculas fracamente adsorvidas, completando a formação de uma camada (I). Em seguida, o substrato foi imerso em solução de PDDA (c), o polycátion o excesso de moléculas é removido em água (d). Após cada ciclo, completa-se a formação de uma bicamada (II).

O segundo eletrodo montado foi de (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub>. A metodologia utilizada (Figura 12) foi praticamente a mesma, mas foram crescidas cinco tetracamadas, sendo que uma delas foi de EPS, feita em solução de 2,0 mg mL<sup>-1</sup>, com o pH ajustado para 5,5.



**Figura 12:** Representação esquemática do processo de fabricação de filmes nanoestruturados por automontagem utilizando dois polieletólitos, Lacase, polissacarídeo e PDDA. O substrato sólido foi imerso em solução (a) PDDA. Em seguida foi imerso em água (b) para remover o excesso e moléculas fracamente adsorvidas, completando a formação de uma camada (I). Em seguida, o substrato foi imerso em solução de EPS (c), e na seqüência, o excesso de moléculas foi novamente removido em água (d). Uma nova camada de PDDA é depositada pela imersão do eletrodo na solução de PDDA (e) e lavado em água (f), formando a terceira camada (III). Por fim, a lacase foi depositada por atração eletrostática, imergindo o eletrodo na solução contendo lacase (g) e lavado em água na seqüência para eliminar o excesso de material não adsorvido. Após cada ciclo, completa-se a formação de uma tetracamada (IV).

#### 4.2.6 MICROBALANÇA CRISTAL DE QUARTZO

Esta técnica permite caracterizar a uniformidade na deposição de um filme pela medida da mudança de freqüência de um cristal piezoelétrico de quartzo (que pode ser interconvertida em massa) em cada camada sucessivamente depositada. O aumento de massa resultante da adsorção na superfície do cristal pode ser estimada pela equação de Suerbrey (SAUERBREY, 1959) usando a seguinte relação entre a massa adsorvida  $\Delta m$  (ng) e a mudança de freqüência  $\Delta f$  (Hz) levando em conta as características do cristal:

$$\Delta m = -6,7 A \Delta f \quad (3)$$

Onde  $A$  corresponde a área aparente do eletrodo da microbalança de cristal de quartzo. Nessas condições, o decréscimo na frequência de 1 Hz resulta num aumento de massa de  $6,7 \text{ ng cm}^{-2}$ .

A adsorção de cada camada foi feita similarmente ao método descrito no item 2.3, porém utilizando um eletrodo de quartzo com uma camada de ouro depositada.

#### **4.2.7 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA**

A caracterização eletroquímica dos eletrodos foi realizada em um potenciostato MPQ-01 (Microquímica). Foi utilizado uma cela eletroquímica, com o contra-eletrodo de tela de Pt, eletrodo de referência de Ag/AgCl, e como eletrodo de trabalho os eletrodos feitos com lacase e EPS pela técnica LBL. O eletrólito utilizado foi de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , variando a concentração de ABTS, dopamina e pH, para os diversos testes realizados.

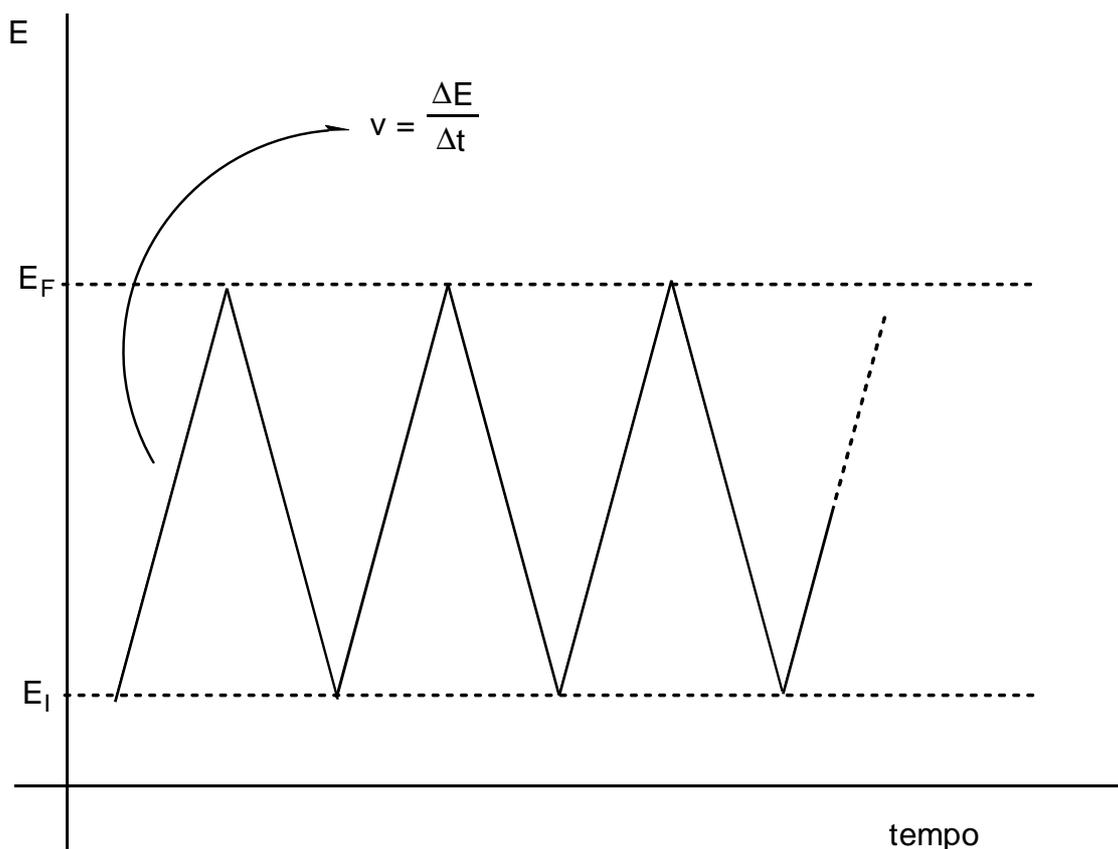
##### **4.2.7.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA**

As técnicas voltamétricas são muito empregadas na eletroanalítica, pois podem ser obtidas em eletrodos de pequenas dimensões, onde a intensidade de corrente é registrada em função do potencial elétrico nele aplicado; a própria raiz da palavra voltametria, “voltam-“, indica que se trata de um palavra relacionada, simultaneamente, com potencial (“volt-“) e corrente (“am-“). O potencial aplicado irá induzir a ocorrência de uma determinada reação de oxidação/redução de uma espécie na interface eletrodo/solução. A voltametria possibilita, assim, o estabelecimento de

relações diretas entre a corrente medida e a concentração da espécie em causa. Podem ser determinadas várias espécies que reajem em diferentes potenciais aplicados, numa mesma experiência, sem a necessidade de qualquer passo de separação prévio. Além disso, os métodos voltamétricos apresentam outras características vantajosas (BRETT e BRETT, 1993):

- são sensíveis e caracterizados por baixos limites de detecção (por exemplo:  $10^{-6}$  M);
- podem dar informação acerca do estado redox, da ocorrência de complexação da espécie em estudo, entre outras;
- podem ser usados em amostras turvas, coloridas ou que contenham partículas sólidas dispersas;
- o tempo necessário para a realização das análises é curto; e,
- a instrumentação e os materiais utilizados apresentam baixo custo (se comparados com as técnicas cromatográficas e espectroscópicas).

A voltametria cíclica consiste na aplicação de uma onda triangular de potencial entre dois valores limites pré-estabelecidos, a uma determinada taxa de variação. A partir de um potencial de inicial  $E_I$ , o potencial do eletrodo é modificado linearmente de acordo com velocidade de varredura,  $v$ , até alcançar de um valor de potencial final  $E_F$ , revertendo ao valor do potencial inicial  $E_I$ , a varredura de potencial prossegue, assim, variando sucessivamente entre  $E_I$  e  $E_F$  (Figura 13). Como resposta a esta aplicação, obtém-se uma corrente eletrônica gerada nos processos eletroquímicos que ocorrem na cela, ou avaliação de potenciais de oxidação e redução, chamado de voltametria cíclica.



**Figura 13:** Esquema representativo da rampa de potencial (E) em função do tempo para geração de um voltamograma cíclico.

A voltametria cíclica é muito utilizada como técnica exploratória do comportamento dinâmico de um determinado composto eletroativo. Permite avaliar a presença de etapas químicas associadas às transferências eletrônicas, verificar a ocorrência de adsorção do reagente ou dos produtos no eletrodo de trabalho e fazer diagnósticos sobre a reversibilidade de um determinado par redox. Quando ambas as espécies do par redox trocam, rapidamente, elétrons com o eletrodo de trabalho, está-se na presença de um *par eletroquimicamente reversível*. Em voltametria cíclica de reações reversíveis o produto da oxidação ou redução inicial é reduzido ou oxidado, respectivamente, quando ocorre a inversão da direção da varredura. A análise

teórica da forma de onda conduz à seguinte equação, para o pico de corrente (exemplificado para uma oxidação):

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (4)$$

onde  $i_p$  é a corrente transferida para o eletrodo;  $n$  é o número de elétrons envolvidos na reação;  $A$  é a área do eletrodo;  $C$  é a concentração da espécie eletroativa,  $D$  o coeficiente de difusão; e,  $v$  a velocidade de varredura.

Com resumo das informações obtidas pela resolução da equação 1 são, geralmente, apresentados na forma de critérios diagnóstico para reações reversíveis:

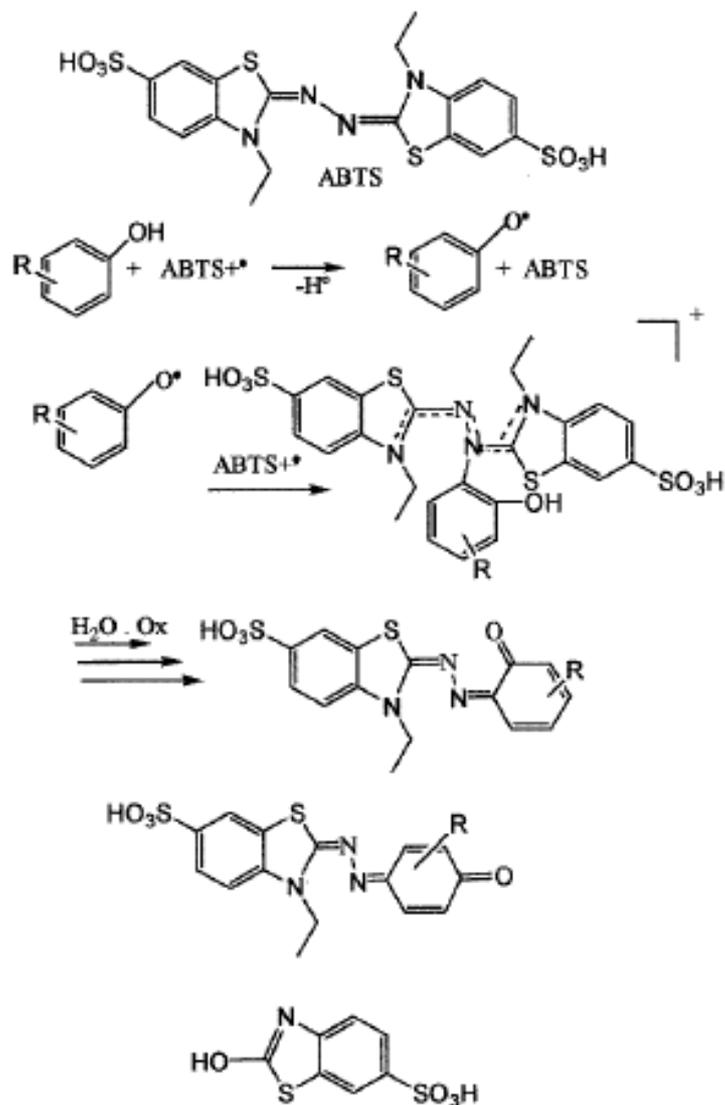
- $I_p$  é proporcional a  $v^{1/2}$ ;
- $E_p$  é independente de  $v$ ; e,
- $|E_{p,OX} - E_{p,RD}| = 59/n$  (mV).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

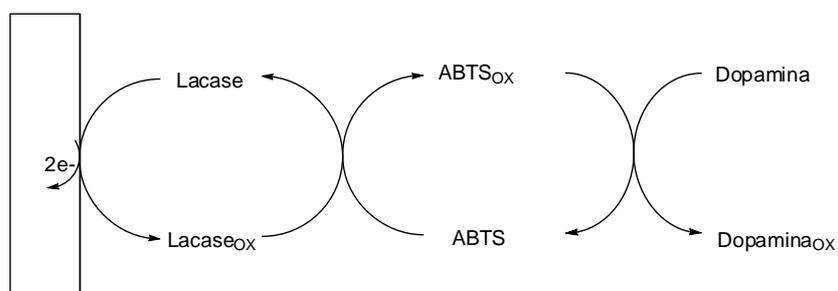
### 5.1 MECANISMO DE DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA VIA CATÁLISE COM LACASE NA PRESENÇA DO MEDIADOR ABTS.

Estudos feitos com compostos fenólicos modelo (POTTHAST *et al.*, 1997; MAJECHERCZYK *et al.*, 1999), mostraram que o ABTS é freqüentemente usado na reação na forma de sal, solúvel em água. Por reação com a lacase desenvolve rapidamente radicais (corados), estáveis e que podem reagir com fenóis, de acordo com os seus potenciais redox, formando novos radicais, fenoxilos, que desencadeiam novas reações. Nessa interação os radicais formados regeneram ABTS (Figura 14). Assim o ABTS oxida o substrato, que por sua vez pode ser reduzido pela lacase, fechando um ciclo como representado na Figura 15.

A oxidação do ABTS dá-se em duas etapas independentes do pH do meio reacional no intervalo de 2 a 11. Os potenciais redox da forma radicalar ( $\text{ABTS}^{\bullet}$ ) e forma iônica ( $\text{ABTS}^{2+}$ ) do ABTS são respectivamente 0,680 e 1,09 V em relação a um Eletrodo Normal de Hidrogênio (MAJECHERCZYK *et al.*, 1999). Não há, no entanto, evidência demonstrada da ação do dication neste processo LMS (*Lacase Mediator System*).



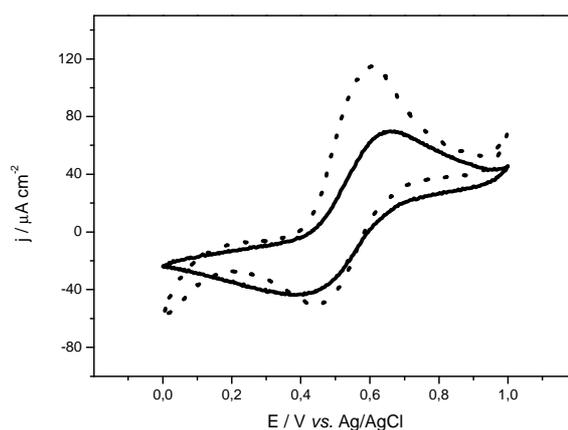
**Figura 14:** Esquema do mecanismo de reação do radical ABTS com fenóis ou radicais fenoxilo e produtos secundários formados do ABTS (POTTHAST *et al.*, 1997)



**Figura 15:** Esquema indicando o efeito do mediador ABTS na catálise enzimática de uma laccase e conseqüente determinação de dopamina.

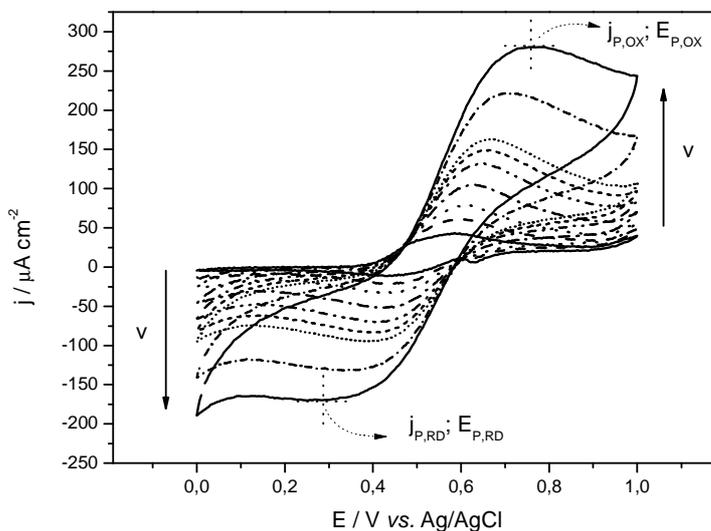
## 5.2 ELETRODO (PDDA/LACASE)<sub>5</sub>

Utilizando-se do eletrodo (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> foi registrado os perfis voltamétrico do referido eletrodo em solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , o mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5, Figura 16. Pelos voltamogramas é possível observar um pico de oxidação em 0,625 V e um pico de redução em 0,432 V. Uma vez que os vários ciclos se sobrepuseram pode se afirmar que não há problemas relacionados com a passivação do eletrodo, pela adsorção irreversível de moléculas de reagente e/ou de produto na superfície do eletrodo, bloqueando os sítios ativos, nas condições do experimento realizado.



**Figura 16:** Perfil voltamétrico do eletrodo (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em: (—) solução de mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; e, (••••) solução de dopamina  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , em ambos os casos o pH ajustado para 5,5.  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .

O experimento de variação da velocidade de varredura foi realizado no intervalo de 2 a 500  $\text{mV s}^{-1}$ , com o objetivo de avaliar o grau de reversibilidade e a natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo. Na Figura 17, são apresentados os voltamogramas cíclicos de uma solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , o mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5.



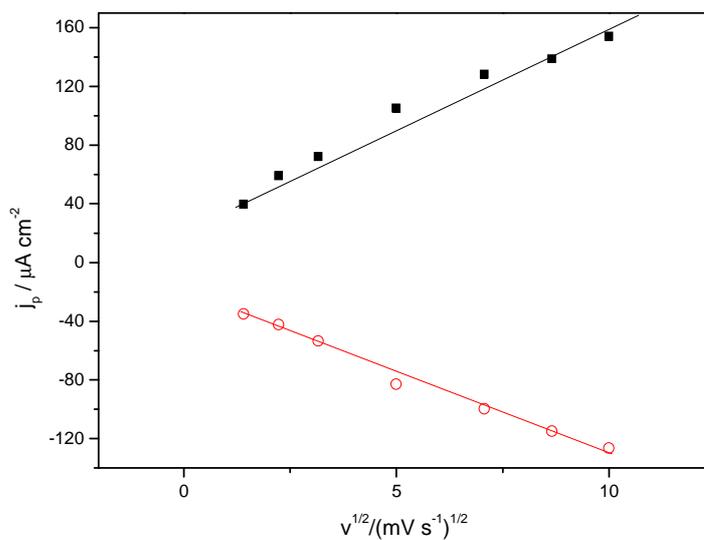
**Figura 17:** Perfis voltamétricos do eletrodo (PDDA/LACASE)5 em solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5. Velocidade de varredura entre 2 e 500  $\text{mV s}^{-1}$ . Representação da densidade de corrente de pico de oxidação ( $j_{P,OX}$ ) e respectivo potencial de pico de oxidação ( $E_{P,OX}$ ) e a densidade de corrente de pico de redução ( $j_{P,RD}$ ) e o respectivo potencial de pico de redução ( $E_{P,RD}$ )

**Tabela I** Valores de densidade de corrente de pico ( $j_{P,OX}$ , oxidação e  $j_{P,RD}$ , redução) e dos potenciais de pico ( $E_{P,OX}$ , oxidação e  $E_{P,RD}$ , redução) para os perfis voltamétricos em diferentes velocidades de varredura do eletrodo (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1$  mol L<sup>-1</sup> com o pH ajustado para 5,5.

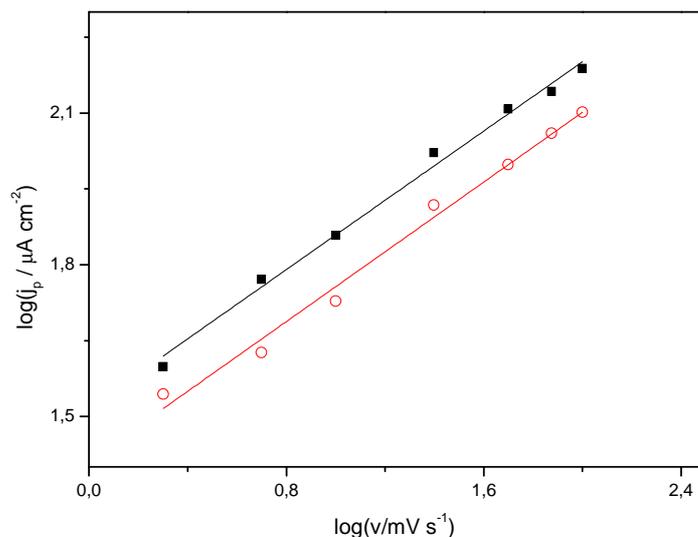
v / mV s <sup>-1</sup>	Oxidação		Redução		$\frac{ j_{P,OX} }{ j_{P,RD} }$
	$E_{P,OX}$ / V	$j_{P,OX}$ / $\mu\text{A cm}^{-2}$	$E_{P,RD}$ / V	$j_{P,RD}$ / $\mu\text{A cm}^{-2}$	
2	0,59	39,70	0,46	-34,99	1,135
5	0,59	59,03	0,45	-42,31	1,395
10	0,62	72,09	0,44	-53,45	1,349
25	0,63	105,2	0,43	-82,88	1,269
50	0,64	128,4	0,41	-99,61	1,289
75	0,65	138,8	0,41	-114,9	1,208
100	0,66	154,2	0,40	-126,4	1,220
250	0,70	178,6	0,36	-147,7	1,209
500	0,76	236,7	0,33	-175,0	1,353

A natureza do transporte de massa que governa os processos redoxes estudados pode ser conhecida pela relação existente entre a densidade de corrente de pico  $j_P$  versus  $v^{1/2}$ , a qual está mostrada na Figura 18. Observa-se que a densidade de corrente de pico aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, o que demonstra que as espécies de ABTS estão limitadas por difusão, como esperado para espécies eletroativas em solução (BRETT e BRETT, 1993). A mesma constatação é corroborada pelos resultados obtidos para os valores dos coeficientes angulares ( $\theta$ ) dos gráficos de  $\log(j_P)$  versus  $\log(v)$ , mostrados na Figura 19, que segundo a literatura é igual a 0,50 para processos difusionais e aproxima-

se de 1 para processos controlados por adsorção na superfície do eletrodo (BRETT e BRETT, 1993). Assim pode se concluir que o processo ocorrido é de difusão de massa e, portanto, não é a cinética enzimática que controla o processo.

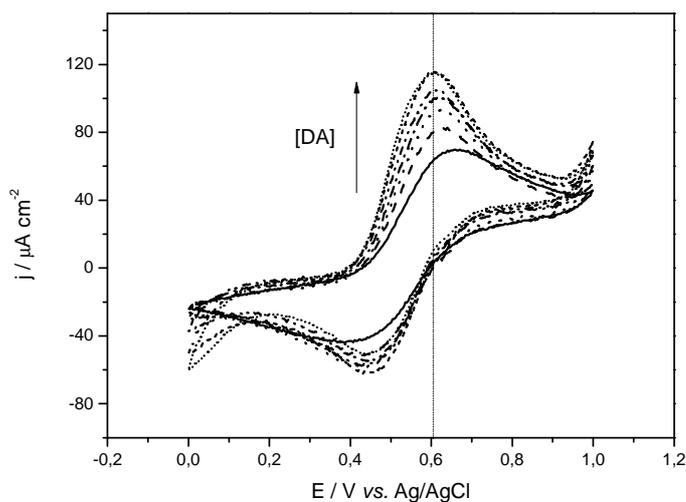


**Figura 18:** Raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v$ ) e a densidade de corrente dos picos ( $j_p$ ) de (■) oxidação e (○) redução para o eletrodo (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5.

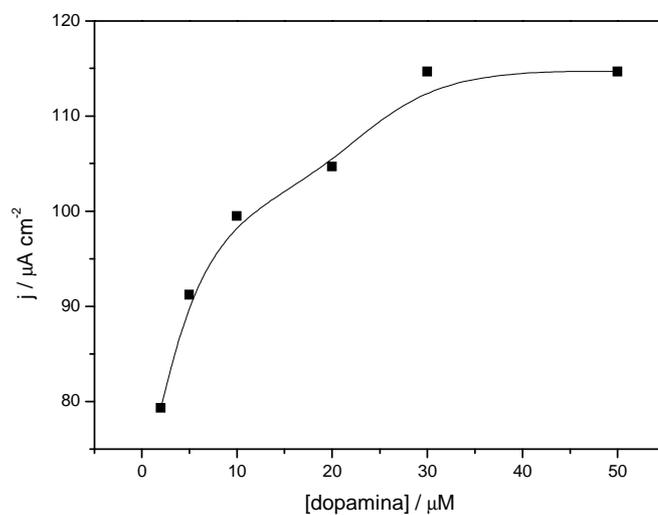


**Figura 19:** Valores de  $\log(v)$  versus  $\log(j_p)$  para: (■) pico de oxidação ( $\theta = 0,342$  e  $R = 0,992$ ) e (○) pico de redução ( $\theta = 0,345$  e  $R = 0,989$ ).

A realização da voltametria cíclica em diferentes concentrações de dopamina (entre  $2,0$  e  $50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) permite a análise da relação entre o pico da densidade de corrente anódico gerado em uma determinada concentração. Este estudo foi feito em velocidade de varredura de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ , e todas as soluções continham o mediador ABTS na concentração de  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , Figura 20. O perfil voltamétrico indica que há um aumento da densidade de corrente de pico de oxidação ( $j_{P,OX}$ ) com o aumento da concentração de dopamina, e o potencial de pico de oxidação ( $E_{P,OX}$ ). Assim, fixando o potencial em  $0,610 \text{ V}$  é possível saber a densidade de corrente gerada e construir uma curva analítica de concentração de dopamina *versus* a corrente, Figura 21.



**Figura 20:** Voltametrias cíclicas do filme (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em diferentes concentrações de dopamina (0,0; 2,0; 5,0; 10; 20; 30; 50 x 10<sup>-6</sup> M) com mediador ABTS 2,0 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup> com o pH ajustado para 5,5.  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura 21:** Curva analítica para o filme de (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em com mediador ABTS 2,0 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup> com o pH ajustado para 5,5; para voltamogramas obtidos em  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .

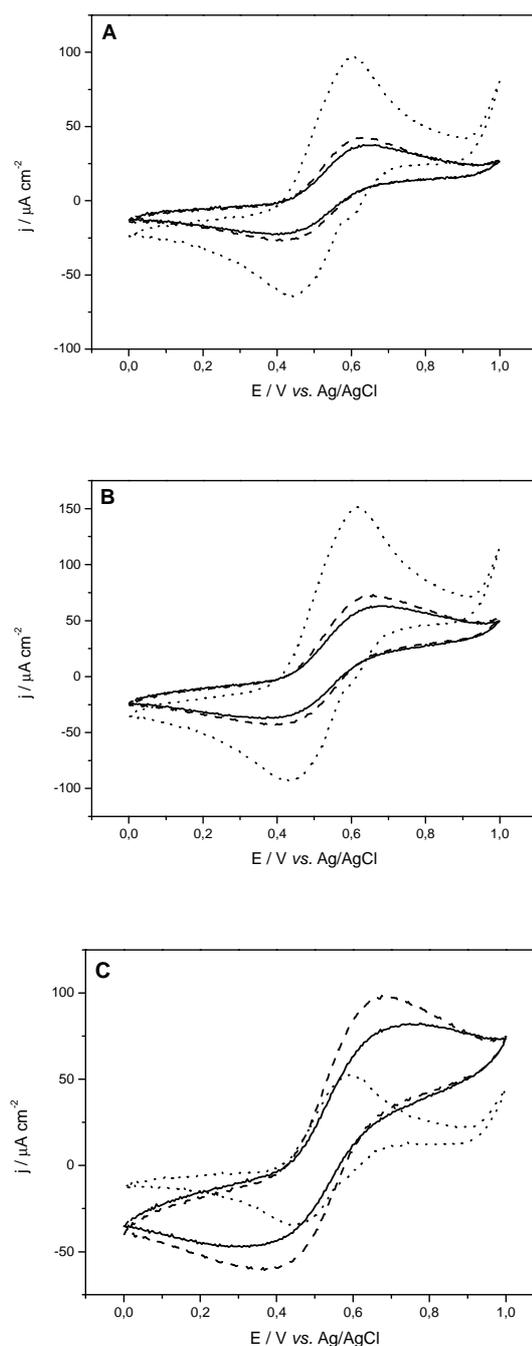
Para averiguar o comportamento do eletrodo em diferentes valores de pHs das soluções, bem como em diferentes concentrações de ABTS

para a detecção de dopamina foram realizado 9 experimentos cujo preparo de soluções foi de acordo com a tabela II. Em todos os experimentos a concentração de dopamina foi mantida constante e igual a  $30 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

**Tabela II:** Experimentos realizados em três soluções diferentes condições: pH e concentração do mediador ABTS.

Experimento	pH	[ABTS]/ $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
1	7	1
2	7	2
3	7	3
4	5	1
5	5	2
6	5	3
7	3	1
8	3	2
9	3	3

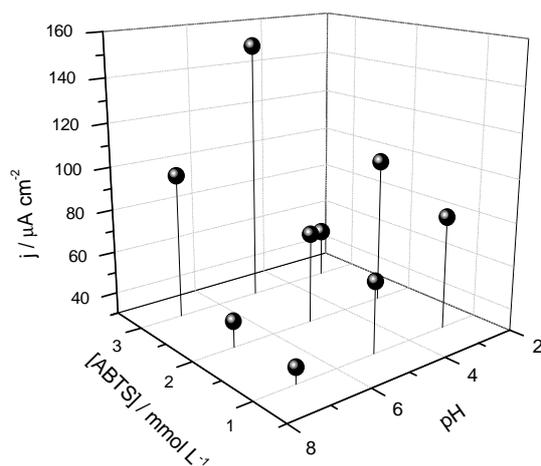
Os experimentos foram realizados todos no mesmo dia, para melhor análise os resultados estão dispostos todos do mesmo pH variando a concentração de ABTS e encontram-se na Figura 22.



**Figura 22:** Voltametrias cíclicas do filme (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo dopamina na concentração de 3,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> com mediador ABTS em diferentes concentrações ((—) 1,0; (- - -) 2,0; e, (•••) 3,0 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) em valores de pH: **(A)** 7,0; **(B)** 5,0; e, **(C)** 3,0.

Analisando os picos de densidade de corrente anódicos em função das diferentes condições empregadas nos experimentos, Figura 23,

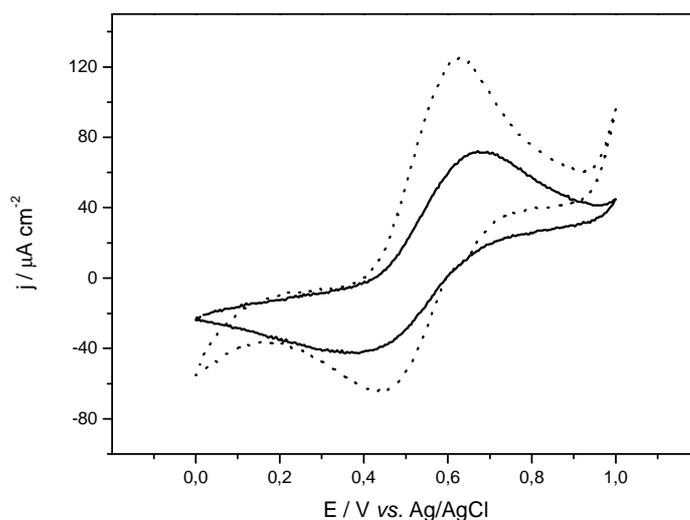
verifica-se que os valores mais altos foram obtidos para em meio de ABTS 3,0 mmol L<sup>-1</sup> e pH 3, e demonstrou menor eficiência em ABTS 1,0 mmol L<sup>-1</sup> e pH 7..



**Figura 23:** Picos de densidade de corrente (oxidação) em duas variáveis: [ABTS] e pH

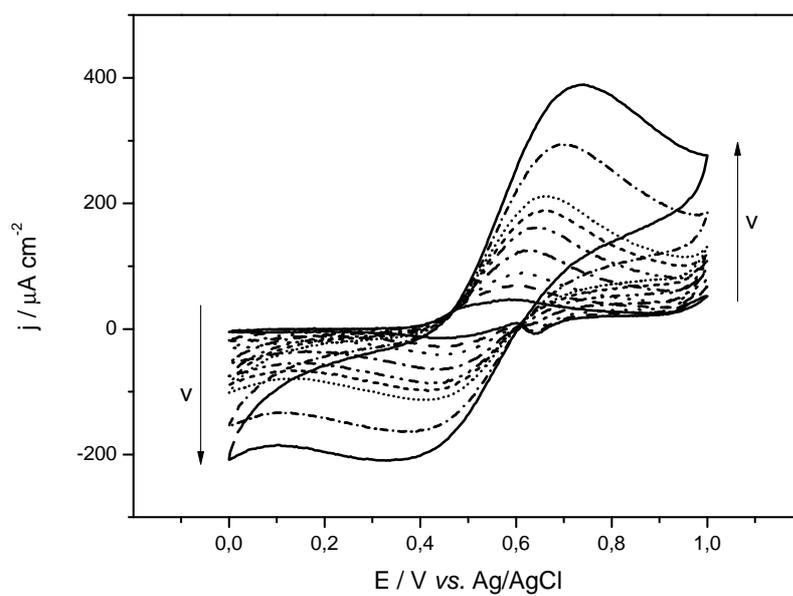
### 5.3 ELETRODO (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub>

Utilizando-se do eletrodo (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> foi registrado os perfis voltamétrico do referido eletrodo em solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , o mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5, Figura 24. Pelos voltamogramas é possível, similarmente ao caso do eletrodo (PDDA/LACASE)<sub>5</sub>, observar um pico de oxidação em 0,63 V e um pico de redução em 0,43 V. Uma vez que os vários ciclos se sobrepuseram pode se afirmar que não há problemas relacionados com a passivação do eletrodo, pela adsorção irreversível de moléculas de reagente e/ou de produto na superfície do eletrodo, bloqueando os sítios ativos, nas condições do experimento realizado.



**Figura 24:** Perfil voltamétrico do eletrodo (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em: (—) solução de mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; e, (••••) solução de dopamina  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , em ambos os casos o pH ajustado para 5,5.  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .

Como realizado anteriormete, um experimento foi realizando variando-se a velocidade de varredura no intervalo de 2 a  $500 \text{ mV s}^{-1}$ , com o escopo de avaliar o grau de reversibilidade e a natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo. Na Figura 25, são apresentados os voltamogramas cíclicos de uma solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , o mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5.



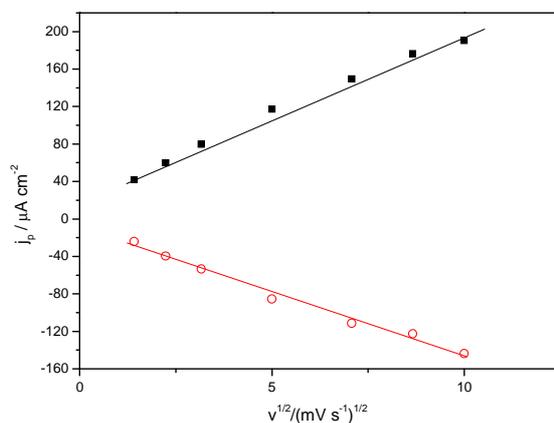
**Figura 25:** Perfis voltamétricos do eletrodo (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5. Velocidade de varredura entre 2 e  $500 \text{ mV s}^{-1}$ .

**Tabela III:** Valores de densidade de corrente de pico ( $j_{P,OX}$ , oxidação e  $j_{P,RD}$ , redução) e dos potenciais de pico ( $E_{P,OX}$ , oxidação e  $E_{P,RD}$ , redução) para os perfis voltamétricos em diferentes velocidades de varredura do eletrodo ((PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5.

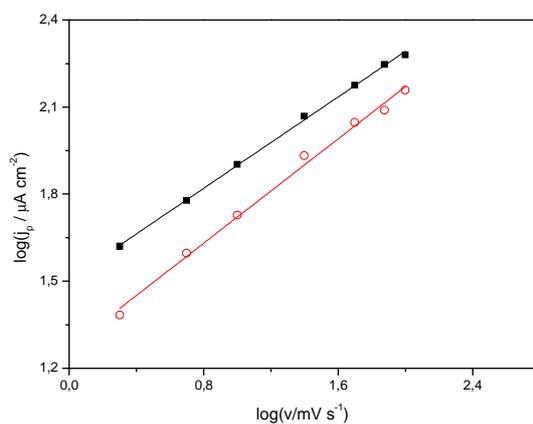
V / $\text{mV s}^{-1}$	Oxidação		Redução		$\frac{ j_{P,OX} }{ j_{P,RD} }$
	$E_{P,OX} / \text{V}$	$J_{P,OX} / \mu\text{A cm}^{-2}$	$E_{P,RD} / \text{V}$	$J_{P,RD} / \mu\text{A cm}^{-2}$	
2	0,58	41,68	0,45	-24,13	1,727
5	0,60	59,96	0,45	-39,49	1,518
10	0,60	79,71	0,45	-53,38	1,493
25	0,63	117,0	0,43	-85,55	1,368
50	0,65	149,5	0,43	-111,41	1,342
75	0,66	176,3	0,42	-122,71	1,436
100	0,66	190,4	0,41	-143,84	1,323
250	0,70	248,0	0,38	-164,36	1,509
500	0,74	328,7	0,33	-261,03	1,259

A natureza do transporte de massa que governa os processos redoxes estudados pode ser conhecida pela relação existente entre  $j_p$  versus  $v^{1/2}$ , a qual está mostrada na Figura 26. Observa-se que a densidade de corrente de pico aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, o que demonstra que as espécies de ABTS estão limitadas por difusão, como esperado para espécies eletroativas em solução (BRETT e BRETT, 1993). A mesma constatação é corroborada pelos resultados obtidos para os valores dos coeficientes angulares ( $\theta$ ) dos gráficos de  $\log(j_p)$  versus  $\log(v)$ , mostrados na Figura 27, que segundo a literatura é igual a 0,50 para processos difusionais e aproxima-se de 1 para processos controlados por adsorção na superfície do eletrodo (BRETT e BRETT, 1993). Assim pode se

concluir que o processo ocorrido é de difusão de massa e, portanto, não é a cinética enzimática que controla o processo.



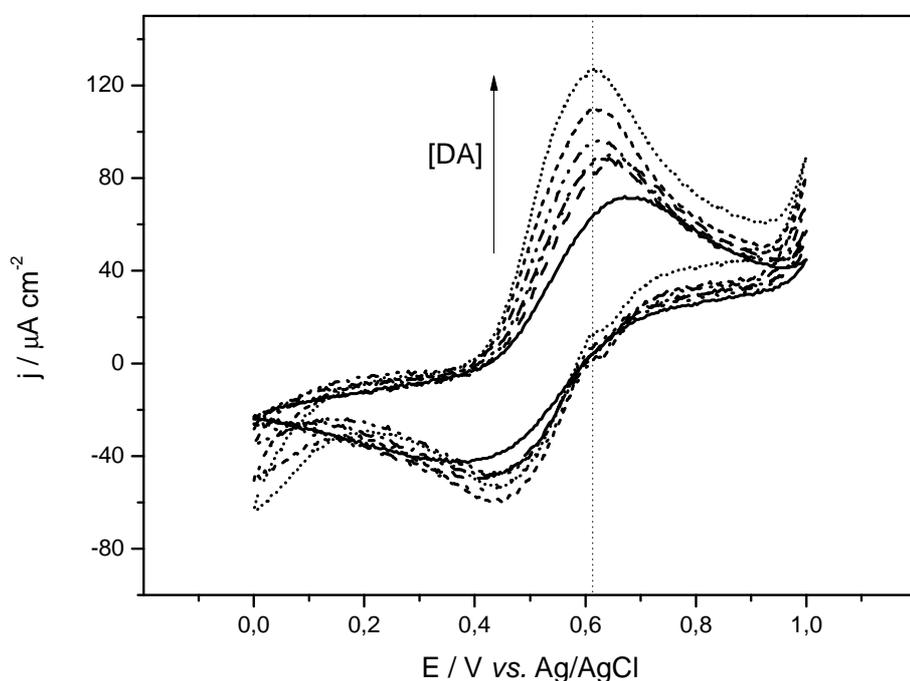
**Figura 26:** Raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v$ ) e a densidade de corrente dos picos ( $j_p$ ) de oxidação e redução para o eletrodo (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5.



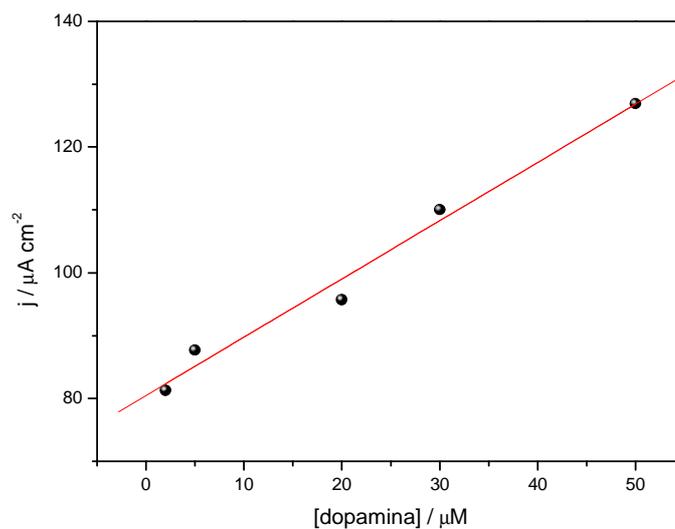
**Figura 27:** Valores de  $\log(v)$  versus  $\log(j_p)$  para: (■) pico de oxidação ( $\theta = 0,393$  e  $R = 0,999$ ) e (○) pico de redução ( $\theta = 0,450$  e  $R = 0,993$ ).

A realização da voltametria cíclica em diferentes concentrações de dopamina permite a análise da relação entre o pico da densidade de

corrente anódico gerado em uma determinada concentração. Este estudo foi feito em velocidade de varredura de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ , e todas as soluções continham ABTS na concentração de  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Assim, fixando o potencial em  $0,610 \text{ V}$  é possível saber a densidade de corrente gerada e construir uma curva analítica de concentração de dopamina *versus* a corrente, Figura 28.

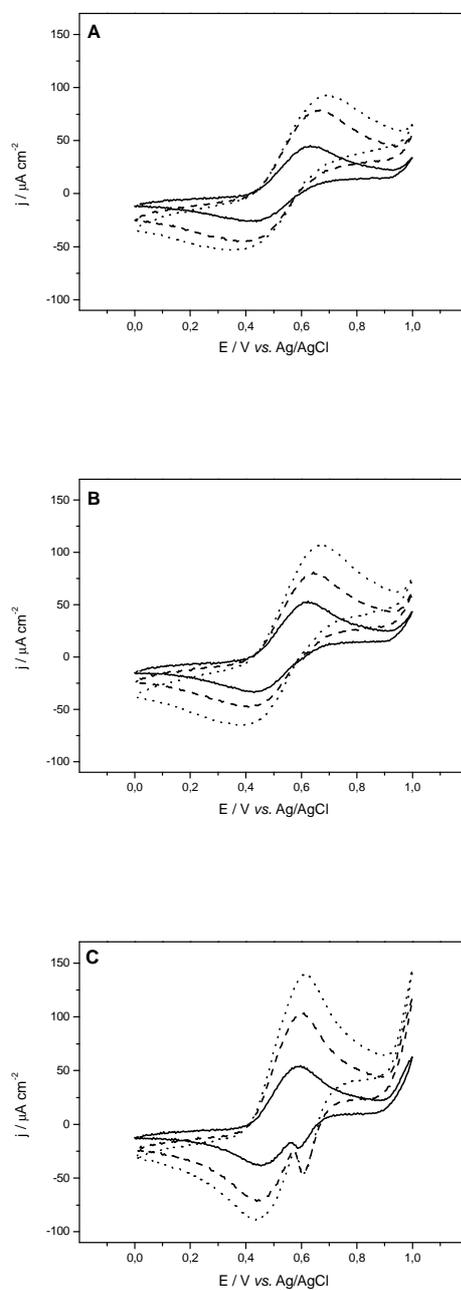


**Figura 28:** Voltametrias cíclicas do filme (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em diferentes concentrações de dopamina (0,0; 2,0; 5,0; 10; 20; 30; 50  $\times 10^{-6} \text{ M}$ ) com mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5.  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .

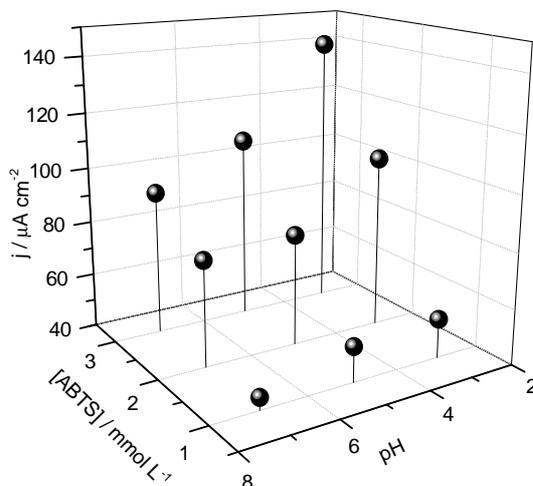


**Figura 29:** Curva analítica para o filme de (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em com mediador ABTS  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para 5,5; para voltamogramas obtidos em  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .

A princípio é importante destacar que a resposta do eletrodo (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> é linear e o eletrodo (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> é exponencial. Analogamente ao filme descrito no item anterior, também foi feito o teste da resposta do eletrodo em diferentes meios, Figura 30, foi seguido o mesmo esquema demonstrado na tabela III. Os resultados também estão dispostos de formar para facilitar as análises, na figura 31.



**Figura 30:** Voltametrias cíclicas do filme (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> utilizando como eletrólito suporte KCl na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo dopamina na concentração de 3,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> com mediador ABTS em diferentes concentrações ((—) 1,0; (- - -) 2,0; e, (• • •) 3,0 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) em valores de pH: **(A)** 7,0; **(B)** 5,0; e, **(C)** 3,0.



**Figura 31:** picos de corrente anódico em duas variáveis: [ABTS] e pH

O filme (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub> apresentou os resultados esperados, já que o meio que melhor resultado apresentou foi aquele para ABTS 3,0 mmol L<sup>-1</sup> e pH 3,0, e o meio que apresentou a menor eficiência foi em ABTS 1,0 mmol L<sup>-1</sup> e pH 7,0. Para este teste também é possível observar que a resposta aumenta com o aumento da concentração do ABTS e com a diminuição do pH.

#### **5.4. EVIDÊNCIA DA FORMAÇÃO DOS FILMES DE (PDDA/EPS/PDDA/LACASE)<sub>5</sub>: RESULTADOS DA MICROBALANÇA DE QUARTZO**

O objetivo de estudar o crescimento dos filmes automontados por Microbalança de Quartzo (MBQ) foi observar a adesão do polissarideo e da lacase na superfície dos eletrodos. Nesse estudo, foram construídas 5 tetracamadas de PDDA/EPS/PDDA/LACASE sobre o cristal de quartzo com um depósito de ouro. Pelos resultados obtidos foi possível observar que o EPS se deposita aproximadamente  $60,63 \text{ ng cm}^{-2}$  em cada camada, enquanto que a lacase deposita-se na taxa de  $93,13 \text{ ng cm}^{-2}$ .

## 6. CONCLUSÕES

- Foi possível a produção do polissacarídeo botriosferana e do lacase a partir do fungo *Botryosphaeria rhodina*;
- Os filmes de  $(\text{PDDA/LACASE})_5$  e  $(\text{PDDA/EPS/PDDA/LACASE})_5$  puderam ser crescidos pela técnica de automontagem “*layer by layer*”, sendo evidenciado pelo aumento de massa verificado pelos experimentos de microbalança de quartzo;
- Os dois eletrodos apresentaram visível diferença de resposta frente a detecção de dopamina. Já que a curva analítica para o filme  $(\text{PDDA/LACASE})_5$  se apresenta de forma exponencial e para o filme  $(\text{PDDA/EPS/PDDA/LACASE})_5$  se apresenta de forma linear;
- Apesar dessa diferença os dois eletrodos apresentaram uma semelhança, que é a difusão de massa controlando o processo redox, já que relação entre a raiz quadrada de varredura e o pico de corrente anódica gerando é linear para ambos; e

- Outra semelhança entre os dois eletrodos é a resposta para a detecção de dopamina com duas variáveis, a concentração de ABTS e o pH. Ambos apresentaram maior eficiência em concentrações maiores de ABTS e em pHs mais ácidos. Fato importante de ressaltar é a anormalidade de resposta do eletrodo (PDDA/LACASE)<sub>5</sub> em ABTS 3,0 mmol L<sup>-1</sup> e pH 3,0, que não apresentou o melhor resultado, algo que era esperado

## REFERÊNCIAS

- AHMED M.U., HOSSAIN M.M., TAMIYA E., Electrochemical biosensors for medical and food applications, **Electroanalysis**. v. 20, p. 616-626, 2008.
- AMINE, A.; BRETT, C. M. A.; PALLESCHI, G. Biosensors for foods safety and environmental monitoring. **Analytical Letters**, v. 37, p. XIII-XIV, 2004.
- BARBOSA, A. M.; STELUTI, R. M.; DEKKER, R. F.H.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M.L. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3;1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v 338, p 1691-1698, 2003.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G., Oxidation of non-phenolic substrates An expanded role for laccase in lignin biodegradation **FEBS Lett.**, v. 267 (1), p. 99–102, 1990.
- BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M.G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1379 (3), p. 381–390, 1998.

- BRETT, A. M. O; BRETT, C. M. A., **Electroquímica**: princípios, métodos e aplicações. Coimbra. Oxford University Press, 1993.
- DECHER, G., Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites, **Science**, v. 277, p. 1232-1237, 1997.
- DECHER, G., HONG, J. D., Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, I. Consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles. **Makromol. Chem., Macromol. Symp.**, v. 46, p. 321-327, 1991.
- DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration na veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria sp.* **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 81-88, 2001.
- DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; Sargent, K. The effect of lignin-related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete, *Botryosphaeria sp.* **Enzyme And Microbial Technology**. v. 30, p. 374-380, 2002.
- DURAN, N.; ROSA M. A.; D'ANNIBALE, A.; et al. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme And Microbial Technology**. v. 31, p. 907-931, 2002.

- FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase **J. Mol. Catal. B: Enzym.** v. 16 (5), p. 231–240, 2002.
- FREIRE, R. S., DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices. **J. Braz. Chem. Soc.** vol.13, p.456-462, 2002.
- FREIRE, R.S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L.T., Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. **Talanta**, v. 54 p. 681–686, 2001.
- GIANFREDA L., RAO M.A.. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. **Enzyme And Microbial Technology.** v. 35, p. 339-354, 2004.
- GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J.-M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation. J.** v. 3, p. 1–25, 1999.
- GIESE, E.C.; BARBOSA, A. M.; CORRADI DA SILVA, M.L. Glucanases Fúngicas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, ed. 30, p. 97- 103, 2003.
- GOMES, S. A. S. S.; REBELO, M. J. F.. A new laccase biosensor for polyphenols determination, **Sensors.** v. 3, p. 166-175, 2003.

JAROSZ-WILKOLAZKA, A. N.; RUZGAS, T.; GORTON, L.. Use of Laccase-Modified Electrode for Amperometric Detection of plant Flavonoids. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 35, p. 238-241, 2004

JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Amperometric detection of mono- and diphenols at *Cerrena unicolor* laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure. **Talanta**. v. 66, p. 1219-1224, 2005.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A. Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66 (2), p. 524–528, 2000.

KARAM, J.; NICELL, J.A. Potential applications of enzymes in waste treatment. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 69, p. 141–153, 1997.

LEITE O. D., FATIBELLO O., BARBOSA A.D.. Determination of catecholamines in pharmaceutical formulations using a biosensor modified with a crude extract of fungi laccase (*Pleurotus ostreatus*). **Journal Of The Brazilian Chemical Society**. v. 14, p. 297-303, 2003.

LEITE O.D., LUPETTI K. O., FATIBELLO O., et al.. Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. **Talanta**. v. 59, p. 889-896, 2003.

LEONOWICZ, A., CHO, N.S.; LUTEREK, J., et al. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal Of Basic Microbiology**. v. 41, p. 185-227, 2001.

LIMA, A. W. O.; VIDSIUNAS, E. K.; NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L.. Vegetable tissue from *Latania* sp: an extraordinary source of naturally immobilized enzymes for the detection of phenolic compounds. **Analyst.**, v. 123, p. 2377-2382, 1998.

LVOV, Y.; ARIGA, K.; ICHINOSE, I.; KUNITAKE, T.; Molecular film assembly via *layer-by-layer* adsorption of oppositely charged macromolecules (linear polymer, protein and clay) and concanavalin A and glycogen. **Thin Solid Films**, v. 284, p. 797, 1996.

MACDIARMID, A G; CHIANG, J C; RICHTER, A F; EPSTEIN, A J. Polyaniline: A new concept in conducting polymers. **Synthetic Metals**. V. 18, n. 1-3, p. 285-290. 1987.

MAJCHERCZYK, A., JOHANNES, C., & HÜTTENNANN, A.. Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediates

by the 2,2' -azino-bis-(3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical and dication. **Appl. Microb. Biotechnol.**,v. 51, p. 267-276, 1999.

MARKOVARGA G, EMNEUS J, GORTON L, et al. Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic-compounds. **Trac-Trends In Analytical Chemistry**. v. 14, p. 319-328, 1995.

MATTOSO, L. H. C.; MEDEIROS, E. S.; PATERNO, L. G.; Fabricação de Filmes Nanoestruturados com Técnica de Automontagem. In: DURÁN, N.;

MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. 1ª ed. São Paulo: Artliber Editora, p. 59- 81,2006.

MATTOSO, L. H.; PATERNO, L. G.; OLIVERIRA Jr. N. O. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. **Quim. Nova**, v. 24, n. 2, p. 228-235, 2001.

MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N., Enzima de interes en enologia: laccase. **Alimentaria**. v. 304, p. 145–150, 1999.

- MINUSSI, R.C.; PASTORE, G. M.; DURAN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends In Food Science & Technology**. v. 13, p. 205-216, 2002.
- MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; SALES, M. G. F.; Flow-injection analysis of dopamine in injections with a periodate-selective electrode. **J. Pharm. Sci.**v. 89, p. 876-884, 2000.
- NEVADO, J. J. B.; GALLEGO, J. M. L.; LAGUNA, P. B.; Spectrophotometric determination of dopamine and methyldopa with metaperiodate by flow-injection analysis; **Fresenius' J. Anal. Chem.** v. 353, p. 221-223, 1995.
- NEVADO, J. J. B.; GALLEGO, J. M. L.; LAGUNA, P. B.; Flow-injection spectrophotometric determination of adrenaline and dopamine with sodium hydroxide. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 14, p. 571-577, 1996.
- ORTEGA, F.; DOMINGUEZ, E.; Selective catalytic detection of dopamine.**J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 14, p. 1157-1162, 1996.
- PIONTEK; K.; ANTORINI, M.; CHOINOWSKI, T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-angstrom resolution containing a full complement of coppers. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 277, p. 37663-37669, 2002.

PONTES, R. S.; RAPOSO, M.; CAMILO, C. S.; DHANABALAN, A.; FERREIRA, M.; OLIVEIRA JR., O. N.; Non-Equilibrium Adsorbed Polymer Layers via Hydrogen Bonding. **Physica Status Solidi A**, v. 173, p. 41, 1999.

POTTHAST, A., KOCH, H., FISHER, K.. The laccase-mediator-system reaction with model compounds and pulp. . Volume F (9th Int. Symp. on Wood and Pulp Chemistry), 2-4. Montreal. Canada, 1997.

QUAN, D.; SHIN, W. S. Modification of electrode surface for covalent immobilization of laccase. **Materials Science & Engineering C- Biomimetic And Supramolecular Systems**. v. 24, p. 113-115, 2004.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry, **Trends In Biotechnology**. v. 24, p. 219-226, 2006.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N, KUBOTA, L. T.; *Biossensores Amperometricos para Determinação de Compostos Fenólicos em Amostras de Interesse Ambiental*. **Química Nova**. v. 24, p. 77-86, 2001

SAGIV, J. Organized Monolayers by Adsorption, I . Formation and Structure of Oleophobic Mixed Monolayers on Solid Surfaces. **Journal of the American Chemical Society** , v. 102, p 92, 1980.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos: Generalidades sobre aplicação de enzimas. **Ed. Legis Summa**, São Paulo: São Paulo. 2004.

SAUERBREY, G. Verwendung Von Schwingquarzen Zur Wagung Dunner Schichten Und Zur Mikrowagung **Z. Phys.** v. 155, p. 206, 1959.

SELBMANN, L.; CROGNALE, S; PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production from *Sclerotium gluconicum* NRRL 3006 and *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 on raw and hydrolysed starchy materials. *Letters in Applied Microbiology*, v.34, p.51-55, 2002.

STOCKTON, W.B.; RUBNER, M. F.; Molecular-Level Processing of Conjugated Polymers. 4. Layer-by-Layer Manipulation of Polyaniline via Hydrogen-Bonding Interactions. **Macromolecules**, v. 30, p. 2717, 1997.

STRADIOTTO, N.R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B., Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry, **Journal Of The Brazilian Chemical Society**. v. 14, p.159-173, 2003.

- SUTHERLAND, J. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v 16, p. 41-46, 1998.
- THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**. v. 140, p. 19–26, 1994.
- ULMAN, A. An introduction to ultrathin films: from Langmuir-Blodgett to self-assembly. 1<sup>a</sup> ed. Boston: **Academic Press**, p. 440, 1991.
- WANG, J.; WALCARIUS, A. Zeolite-modified carbon paste electrode for selective monitoring of dopamine. **J. Electroanal. Chem.** v. 407, p. 183-187, 1996.
- WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**. v. 22, p. 161-187, 2003.
- WILSON, G. S.; GIFFORD, R. Biosensors for real-time in vivo measurements. **Biosensors & Bioelectronics**. v. 20, p. 2388-2403, 2005.
- XU, F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. **Biochemistry**. v. 35, p. 7608–7614, 1996.

YAROPOLOV, A.I.; SKOROBOGATKO, O.V.; VARTANOV, S. S.; et al.

Laccase - properties, catalytic mechanism, and applicability.

**Applied Biochemistry And Biotechnology**. v. 49, p. 257-280,  
1994.

ZHENG, W.; ANGELOPOULOS, M.; EPSTEIN, A. J. ; MACDIARMID, A. G.;

Experimental Evidence for Hydrogen Bonding in Polyaniline:

Mechanism of Aggregate Formation and Dependency on

Oxidation State. **Macromolecules**, v. 30, p. 2953 -2955, 1997.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)