PROGRAMA EQ-ANP

Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural

Utilização do tecido fúngico (corpo de frutificação) de *Agaricus bisporus* como biocomponente no desenvolvimento de um biossensor amperométrico de fenol

Lívia Maria da Costa Silva

Dissertação de Mestrado

Orientador(es)
Prof. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.
Prof. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

Março de 2009

UTILIZAÇÃO DO TECIDO FÚNGICO (CORPO DE FRUTIFICAÇÃO) DE *Agaricus bisporus* COMO BIOCOMPONENTE NO DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO DE FENOL

Lívia Maria da Costa Silva

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado por:

_____
Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.
(orientador – presidente da banca)

_____
Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.
(orientador)

_____
Denize Dias de Carvalho, D.Sc.

_____
Marta Antunes Pereira Langone, D.Sc.

_____
Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Março de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Lívia Maria da Costa

Utilização do tecido fúngico (corpo de frutificação) de *Agaricus bisporus* como biocomponente no desenvolvimento de um biossensor amperométrico de fenol / Lívia Maria da Costa Silva. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2009.

xviii, 116 f.; il.

(Dissertação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2008.

Orientador(es): Andréa Medeiros Salgado e Maria Alice Zarur Coelho.

1. *Agaricus bisporus*. 2. Fenol. 3. Biossensor. 4. Tese. (Mestrado – UFRJ/EQ). 5. Andréa Medeiros Salgado e Maria Alice Zarur Coelho.

I. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico minha dissertação de Mestrado aos meus pais Maria Palmira da Costa Silva e Rubson Pereira da Silva e a minha falecida vovó Maria de Lourdes Ferreira dos Santos por se constituírem estímulos que me impulsionaram a buscar vida nova a cada dia.

"Seja qual for o seu sonho, comece. Ousadia tem genialidade, poder e magia."

Goethe.

AGRADECIMENTOS

Agradecer a todos, que de uma forma ou de outra estiveram envolvidos nessa tarefa difícil de execução da dissertação, é o mínimo que posso fazer para demonstrar minha imensa gratidão e expressar também o quanto precisamos do apoio uns dos outros para desenvolver qualquer tarefa. Por isso, reservo este pequeno espaço para manifestar meu agradecimento a todas elas e de forma particular:

À minha vovó Maria de Lourdes Ferreira dos Santos (*in memorium*), pelo amor e carinho dedicados a minha pessoa durante toda a vida;

Aos meus pais, Maria Palmira da Costa Silva e Rubson Pereira da Silva, pelo impecável apoio e incentivo por minha ascensão pessoal, principalmente pela inesgotável confiança nas minhas capacidades. Eu os devo a possibilidade do meu mestrado e, por sua vez, a possibilidade de realização deste trabalho;

Aos meus irmãos, Milena da Costa Silva e Jansen da Costa Silva, pelo apoio e implicância diários. Eles fazem meus dias serem mais divertidos e agitados;

Ao meu grande amigo Marcel Assumpção Leite Silva, pela total dedicação a minha pessoa em todos os momentos da minha vida;

Aos meus grandes amigos Jorginho e Mariana Cascardo (Mary) pelos muitos anos de amizade e dedicação;

Ao pessoal da minha turma do curso de graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e do Meio Ambiente da UFF pelo apoio, em especial: Alan Santos, Gabriel Meliga, Rafael Carneiro e Murilo Miranda. Além disso, sou muito grata pela amizade do “agregado” Fabian Robert;

A minha grande amiga Gabrielle Assumpção pelo apoio diário e pelas *nights* que me fizeram relaxar em momentos estressantes do desenvolvimento do trabalho;

Ao meu amigo Hiron (japa), pelas conversas e *emails* que me incentivaram bastante, fazendo com que eu seguisse sempre em frente, buscando meus objetivos pessoais e profissionais;

A equipe do laboratório 103, pela colaboração durante a execução do trabalho;

A equipe do pequeno e aconchegante laboratório 122, Laboratório de Sensores Biológicos, pela imensa ajuda e animação, principalmente as meninas: Ariana, Andréa, Ana Cláudia, Gabriela e Giselle;

As minhas orientadoras Andréa Medeiros Salgado e Maria Alice Zarur Coelho, pela habilidade com que me orientaram nesse trabalho. Em especial, à primeira pelo imenso carinho, atenção e paciência diários;

Aos meus amigos e amigas que possibilitaram essa caminhada com seu apoio, confiança e estímulos generosamente oferecidos. Eles, que muitas vezes me ouviram e me deram uma palavra de ânimo, tanto quando eu alcançava minhas pequenas conquistas, como quando enfrentava algumas dificuldades e adversidades que iam surgindo. Não os citarei por nomes, pois não conseguiria com justiça lembrar de todos eles;

Agradeço ao apoio financeiro da Agência Nacional do Petróleo – ANP – e da Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP – por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo e Gás – PRH-ANP/MCT, em particular ao

PRH 13, da Escola de Química - Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural.

Por fim, durante a realização do curso, muitas pessoas, mesmo que inconscientemente, colaboraram no meu trabalho, seja por meio de informações, seja por meio das reflexões provocadas. Foram tantas que fica impossível citá-las pelos nomes, portanto a todos um *MUITO OBRIGADA* por terem me ajudado na realização da minha pesquisa que, hoje, concede-me a oportunidade de finalizar uma etapa na minha vida acadêmica: a obtenção do título de Mestre.

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências, com ênfase na área de Petróleo e Gás Natural.

UTILIZAÇÃO DO TECIDO FÚNGICO (CORPO DE FRUTIFICAÇÃO) DE *Agaricus bisporus* COMO BIOCOMPONENTE NO DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO DE FENOL

Lívia Maria da Costa Silva

Março, 2009

Orientadores: Prof. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.
Prof. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

A determinação de fenóis é de extrema importância ambiental, visto que os fenóis são poluentes tóxicos encontrados em diversos efluentes industriais. Análises de espécies fenólicas têm sido realizadas, principalmente, por meio de métodos espectrofotométricos e cromatográficos. Entretanto, estes não permitem, facilmente, um monitoramento contínuo *in situ*, pois são caros, lentos e necessitam de operadores treinados. A fim de viabilizar uma metodologia analítica que permita tal monitoração, o presente trabalho se propõe a utilizar o tecido fúngico íntegro de *Agaricus bisporus*, dada sua atividade tirosinásica, fazendo o papel de biocomponente de um biossensor para detecção de fenóis e tendo o eletrodo de oxigênio como transdutor. A tirosinase é uma polifenol oxidase que tem capacidade de transformar fenóis em produtos menos solúveis em água, as quinonas.

A metodologia experimental adotada visou a escolha do melhor tamanho de tecido fúngico, temperatura e pH para a remoção de fenol em solução padrão, assim como, foi analisada a possível adsorção do analito no tecido, a influência do envelhecimento do tecido fúngico na remoção de fenol e a quantificação da

concentração de fenol presente no próprio tecido ainda sem utilização. Posteriormente, para a montagem preliminar do biossensor, propriamente dito, o eletrodo de oxigênio foi utilizado como transdutor, investigando a relação linear entre a variação de oxigênio dissolvido e a concentração de fenol da solução aquosa. Para a calibração do instrumento, estudou-se o tempo de reação e a quantidade de tecido necessários por promover respostas confiáveis e com menor erro entre as análises. As influências da saturação da solução com ar antes da leitura e a lavagem do eletrodo também foram analisadas.

Os resultados mostraram que não houve adsorção no tecido e que este apresenta fenol em sua composição. Além disso, as melhores condições de atuação da enzima tirosinase para remoção de fenol foram: cogumelo cortado em pedaços de 1,0cm^3, pH 8,0 e faixa de temperatura de 35ºC-45ºC. Já na confecção do sistema biossensor, o tempo de reação escolhido foi de 1 minuto e a quantidade de 5g do biocomponente. Porém, ao contrário do esperado, não houve uma relação linear entre a variação de oxigênio e a concentração de fenol utilizando esta configuração do biossensor.

Abstract of a Dissertation presented to Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - EQ/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science with emphasis on Petroleum and Natural Gas.

***Agaricus bisporus* AS A BIOCOMPONENT OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR PHENOL DETERMINATION**

Lívia Maria da Costa Silva

Março, 2009

Supervisors: Prof. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.
Prof. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

The measurement of the quantities of phenols present in many industrial effluents is quite important due to the high toxic pollutant impact in the environment. Usually the analyses of the phenolic species have been carried out by the chromatographic and spectrophotometric methodology. Both methods however showed to be disadvantageous because they are very expensive. In addition they have a sluggish response time also demanding a trained operator to perform the measurements since they are difficult to be implemented *in situ* in a continued-monitoring basis as well. The present work is, in deed, an effort to develop an analitical method, which intends to demonstrate that a continuous monitoring of phenols is achievable by using the mushroom tissue of *Agaricus bisporus* through the activity feature of the tyrosinase. The tyrosinase would be the biocomponent sensitive to phenols in a biosensor. Meanwhile the oxygen electrode would operate as a transducer. Theoretically the tyrosinase as a polyphenol oxidase would be capable to convert the phenols into products less soluble in water - the quinones.

The experimental methodology adopted in the development in this work aimed to select the best size of the mushroom tissue, the ideal temperature and the solution pH

for the extraction of the phenols in a standard solution. Additionally it was evaluated the possibility of adsorption of the analyte in the tissue, the influence of aging of the tissue in the removal of phenol and quantification of the phenol concentration present in the tissue. Then to construct the biosensor, the oxygen electrode was used as a transducer. The linear relationship between the variation of dissolved oxygen and concentration of phenol in aqueous solution was investigated. For the calibration of the instrument, studying the time of reaction and amount of tissue needed to promote reliable answers and with less error from the analysis were analyzed. The influences of saturation of the solution with air before reading and washing of the electrode were also studied.

The results of the test showed there was no adsorption of phenols by the mushroom tissue. Thereafter the phenols were detected in the composition of the mushroom tissue itself. The essays also revealed that the best responses of the tyrosinase enzyme to extract the phenol from the standard solution were got on using the mushrooms sliced into pieces sized as 1,0cm^3, immersed in a alcaline medium at pH equal 8,0, and within the temperature range 35ºC-45°C. During the preparation of a biosensor system the time of the reaction was set in 1 minute for an amount of 5g of the biocomponent. It was expected should exist a linear relationship between the variation of the concentration of the oxygen versus the concentration of the phenol using the configuration of the biosensor aforementioned. The result of the tests showed a reversed behavior.

ÍNDICE

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO **1**

1.1 - Considerações gerais 1

Capítulo 2 - OBJETIVOS **5**

2.1 - Objetivo geral 5

2.2 - Objetivos específicos **5**

Capítulo 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7

3.1 - Compostos fenólicos **7**

3.2 – Tirosinase 10

3.2.1. – Características gerais **10**

3.2.2. – Aplicações da tirosinase de cogumelos 16

3.3. – Reino Fungi **17**

3.3.1. – Macrofungo *Agaricus bisporus* 20

3.4. – Biossensores **21**

3.4.1. – Definição 21

3.4.2. – Breve histórico **24**

3.4.3. – Componentes e funcionamento de um biossensor 26

3.4.4. – Aplicação dos biossensores **45**

3.4.5. – Mercado dos biossensores 49

Capítulo 4 – MATERIAL E MÉTODOS **52**

4.1 – Equipamentos 52

4.2 - Material de estudo: tecido fúngico **52**

4.3. - Métodos analíticos 53

4.3.1. – Procedimento de extração da tirosinase **53**

4.3.2. – Procedimento de dosagem da atividade enzimática dos extratos 53

4.3.3. – Procedimento de dosagem do fenol **54**

4.3.4. - Testes de remoção do fenol usando o tecido fúngico 55

4.3.5. - Verificação e quantificação da presença do fenol no tecido fúngico **58**

4.3.6. - Testes de estudo de adsorção de fenol no tecido fúngico 59

4.3.7. - Testes usando tecido fúngico como biocomponente e o eletrodo de oxigênio como transdutor **59**

Capítulo 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 64

5.1. - Extração e determinação da atividade enzimática da tirosinase **64**

5.2.- Estudo do efeito do envelhecimento do cogumelo na remoção de fenol 67

5.3. - Seleção do melhor tamanho do tecido fúngico para a reação de remoção do fenol **68**

5.4. - Estudos visando à constatação da presença de fenol no tecido fúngico e sua quantificação 71

5.5. - Escolha da melhor temperatura de reação de remoção do fenol usando o tecido fúngico íntegro como fonte da enzima tirosinase **74**

5.6. - Escolha do melhor pH de reação de remoção do fenol usando a enzima tirosinase presente no tecido fúngico íntegro 78

5.7. - Ensaios de estudo de adsorção no tecido fúngico durante o procedimento de remoção do fenol **81**

5.8. - Estudo das melhores condições relativas à quantidade de massa de tecido fúngico e tempo de reação para a construção do biossensor 84

5.9. - Estudos de repetibilidade do sistema biossensor (eletrodo de oxigênio e tecido fúngico) e análise da influência e necessidade de lavagem do eletrodo de oxigênio a cada leitura **89**

5.10. - Testes de estudo da influência da saturação inicial das soluções em relação ao oxigênio dissolvido, nas leituras do eletrodo de oxigênio 93

5.11. - Estudos de estabilidade do sistema biossensor montado: eletrodo de oxigênio e tecido fúngico **99**

Capítulo 6 - CONCLUSÕES 103

Capítulo 7 - SUGESTÕES **105**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 107

ANEXO 1 116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química de alguns compostos fenólicos	**7**
Figura 2	Esquema do grupo prostético da tirosinase	13
Figura 3	Esquema simplificado da reação catalisada pela enzima tirosinase	**15**
Figura 4	Funcionamento detalhado da enzima tirosinase	16
Figura 5	Esquema das principais estruturas de um cogumelo	**19**
Figura 6	Imagem do corpo de frutificação de *Agaricus bisporus*	21
Figura 7	Esquema geral de funcionamento de um biossensor	**27**
Figura 8	Classificação dos biossensores de acordo com o elemento biológico sensível	29
Figura 9	Valores projetados para o mercado de biossensores e bioeletrônicos até 2009	**49**
Figura 10	Expansão esperada para o mercado para nano biossensores	50
Figura 11	Comparação da atividade da tirosinase nos extratos obtidos pelo processo de extração enzimática descrito no item 4.3.1	**65**
Figura 12	Perfil da concentração de fenol, ao longo de 180 minutos, utilizando tecido fúngico de tamanho de 1,0cm^3 com 3 e 18 dias de compra do lote	68
Figura 13	Remoção de fenol com tecido fúngico de tamanhos 0,5 cm^3; 1,0cm^3 e 1,5cm^3	**69**
Figura 14	Ensaios relativos à presença de fenol no tecido fúngico íntegro	72
Figura 15	Testes visando quantificar a concentração de fenol no tecido íntegro no tamanho de 1,0cm^3	**73**
Figura 16	Comparação entre as eficiências de atuação da tirosinase nas diferentes temperaturas testadas	75
Figura 17	Comparação entre a remoção do fenol da solução padrão utilizando tampão fosfato com diferentes valores de pH	**79**
Figura 18	Resultados dos testes de estudo de adsorção de fenol no tecido fúngico de tamanho 1,0cm^3	82
Figura 19	Resultados dos testes de estudo de adsorção de fenol no tecido fúngico de tamanho 0,5cm^3	**83**
Figura 20	Resultados dos testes visando estudar a melhor quantidade do biocomponente (1g, 3g e 5g) e o melhor tempo de reação que variou de 5 a 30 minutos	86

Figura 21 Resultados dos testes visando estudar a melhor quantidade do biocomponente (1g, 3g e 5g) e o melhor tempo de reação que variou de 1 a 5 minutos **88**

Figura 22 Teste de repetibilidade das análises usando o mesmo pedaço de tecido fúngico de 1,0cm^3 com lavagem do eletrodo de oxigênio entre as leituras 91

Figura 23 Teste de repetibilidade das análises usando o mesmo pedaço de tecido fúngico de 1,0cm^3 sem lavagem do eletrodo de oxigênio entre as leituras **92**

Figura 24 Testes comparativos de influência do borbulhamento de ar antes das leituras com o eletrodo de oxigênio 94

Figura 25 Resultado dos primeiros testes visando construir a curva de calibração do sistema biossensor montado usando 5g de tecido fúngico de 1,0cm^3; temperatura ambiente; pH 8,0; sem lavagem do transdutor; borbulhamento de ar antes das leituras; faixa do analito de 0 a 10ppm; e tempo de reação de 1 minuto **95**

Figura 26 Resultado dos testes visando construir a curva de calibração do sistema biossensor montado usando 5g de tecido fúngico de 1,0cm^3; temperatura ambiente; pH 8,0; sem lavagem do transdutor; borbulhamento de ar antes das leituras; faixa de fenol de 3 a 10ppm; e tempo de reação de 1 minuto 96

Figura 27 Testes realizados para construir a curva de calibração do sistema biossensor montado usando 3g de tecido fúngico de 1,0cm^3; temperatura ambiente; pH 8,0; sem lavagem do transdutor; borbulhamento de ar antes das leituras; faixa de fenol de 0 a 5ppm; e tempo de reação de 5 minutos **97**

Figura 28 Testes realizados para construir a curva de calibração do sistema biossensor montado usando 5g de tecido fúngico de 1,0cm^3; temperatura ambiente; pH 8,0; sem lavagem do transdutor; borbulhamento de ar antes das leituras; faixa de fenol de 0 a 5ppm; e tempo de reação de 3 minutos 98

Figura 29 Estudo da estabilidade usando os mesmos 5g de tecido fúngico ao longo dos dias usando 5g de tecido fúngico de 1,0cm^3; temperatura ambiente; pH 8,0; sem lavagem do transdutor; borbulhamento de ar antes das leituras; faixa de fenol e 3 a 10ppm; e tempo de reação de 1 minuto **100**

Figura 30 Estudo da estabilidade usando os mesmos 5g de tecido fúngico ao longo dos dias usando 5g de tecido fúngico de 1,0cm^3; temperatura ambiente; pH 8,0; sem lavagem do transdutor; borbulhamento de ar antes das leituras; faixa de fenol de 3 a 10ppm; e tempo de reação de 1 minuto 101

Figura 31 Estudo da estabilidade usando os mesmos 5g de tecido fúngico ao longo dos dias usando 5g de tecido fúngico de 1,0cm^3; temperatura ambiente; pH 8,0; sem lavagem do transdutor; borbulhamento de ar antes das leituras; faixa de fenol de 3 a 10ppm; e tempo de reação de 1 minuto **101**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Aplicações de tecidos animais e vegetais em biossensores	**33**
Tabela 2	Comparação entre os componentes biológicos usados em biossensores, mostrando suas vantagens e desvantagens	36
Tabela 3	Tipo de transdutores empregados em biossensores	**39**
Tabela 4	Biossensores amperométricos para análise de compostos fenólicos a base de tecidos e célula	42
Tabela 5	Resultados dos testes realizados visaram estudar a melhor quantidade do biocomponente e o melhor tempo de reação, onde se apresentam a média das 5 réplicas realizadas e o respectivo desvio entre elas no tempo que variou de 5 a 30 minutos	**85**
Tabela 6	Resultados dos testes realizados visaram estudar a melhor quantidade do biocomponente e o melhor tempo de reação, onde se apresentam a média das 5 réplicas realizadas e o respectivo desvio entre elas no tempo que variou de 1 a 5 minutos	87

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

A determinação de fenóis é de grande importância ambiental, uma vez que um número considerável de poluentes orgânicos, largamente distribuído no meio ambiente, possui estrutura fenólica. Fenóis e seus derivados, como clorofenóis e compostos aromáticos relacionados, são conhecidos pela sua elevada toxicidade e por serem compostos comuns em efluentes industriais, oriundos das atividades de produção de plásticos, corantes, tintas, drogas, antioxidantes, pesticidas, detergentes e principalmente de papel e celulose (ATLOW *et al*., 1984; ROSATTO, 2000; ROSATTO *et al*., 2001; FREIRE *et al*., 2002; LOUZADA *et al*., 2004; TOPÇU *et al*., 2004; VIEIRA *et al*., 2004; SANTOS DE ARAUJO *et al*., 2006).

Mesmo em pequenas concentrações (< 1 ppm), os componentes fenólicos afetam o gosto e odor de águas potáveis. Muitos destes compostos possuem efeitos tóxicos em animais e plantas, pois penetram facilmente pelas membranas celulares, determinando um amplo espectro de genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos hepato-tóxicos, além de afetarem as velocidades das reações biocatalisadas nos processos de respiração e fotossíntese. Além disso, vários fenóis substituídos, como cloro e nitrofenóis, são altamente tóxicos para o homem e organismos aquáticos (ROSATTO, 2000; ROSATTO *et al*., 2001; FREIRE *et al*., 2002; LOUZADA *et al*., 2004).

Até o presente momento, análises tanto de fenol como de espécies fenólicas têm sido realizadas, principalmente, por meio de métodos espectrofotométricos,

cromatográficos e fluorimétricos. Entretanto, estas técnicas não permitem, facilmente, um monitoramento contínuo *in situ*, pois são caras, lentas e necessitam de operadores treinados (ROSATTO, 2000; ROSATTO *et al*., 2001; FREIRE *et al*., 2002; KOCHANA *et al*., 2008a).

Atualmente, existe um consenso universal a respeito da necessidade de monitorar continuamente a concentração de contaminantes químicos nos corpos d'água naturais e nos efluentes industriais que são descarregados no meio aquático natural. Os custos envolvidos na detecção desses poluentes ambientais são muito elevados, o que gera uma série de limitações ao número de amostras, afetando diretamente a confiabilidade do monitoramento ambiental (ROSATTO *et al*., 2001).

Nesse contexto de grande preocupação com o meio ambiente, o Brasil apresenta diversas leis ambientais e resoluções do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), que estão constantemente sendo revistas, e estas reafirmam a necessidade de sistemas de detecção mais versáteis para o monitoramento ambiental e tem estimulado o desenvolvimento de uma gama de métodos analíticos. Essa nova mentalidade aliada aos avanços na bioquímica, biotecnologia, microeletrônica e das fibras óticas, e ao desenvolvimento na formação de novos sensores e de novas técnicas de preparação de sensores específicos que combinam a alta especificidade dos sistemas biológicos com as várias possibilidades de projetos de circuitos eletrônicos, fez surgir os denominados biossensores (SHARMAT & ROGERS, 1994).

Os biossensores representam ferramentas promissoras para suplementar as técnicas existentes, devido às suas características únicas, tais como: seletividade,

relativo baixo custo de construção e estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis. Estas ferramentas não podem ser encaradas como uma substituição das técnicas analíticas clássicas, mas sim como um complemento a estas, pois algumas delas podem apresentar problemas de estabilidade (ROSATTO, 2000).

O funcionamento de um biossensor, de uma forma geral, envolve a especificidade e alta sensibilidade do componente biológico com o substrato de interesse. Em seguida, como produto desta interação entre a molécula biológica e o substrato, variações de um ou mais parâmetros físico-químicos são gerados e estes produzem íons, elétrons, calor, luz, variação de massa, fluorescência ou gases, que são convertidos em um sinal elétrico quantificável e processável pelo uso de um transdutor adequado (DANIELSSON *et al.*, 1981). Os biossensores, além de se apresentarem como instrumentos promissores para o monitoramento ambiental rápido e contínuo, possuem um mercado potencial amplo de aplicação, cobrindo as áreas de diagnose clínica, militar, controle de processos, alimentícia, de bebidas e agricultura.

Os problemas de estabilidade supracitados e a falta de credibilidade dos biossensores para aplicação em algumas áreas são ainda grandes desafios que contribuem para a escassez destes instrumentos no mercado. No entanto, esforços têm sido realizados buscando melhorar a confiança de modo a obter um sensor com a performance desejada em termos de sensibilidade, alcance dinâmico e reprodutibilidade.

Na busca por componentes biológicos mais baratos e eficazes para a produção de biossensores para detecção de compostos fenólicos, as polifenol oxidases, em

especial a tirosinase, vêm sendo bastante pesquisada nos últimos anos (DANTONI *et al*., 1998; NISTOR *et al*., 1999; ROSATTO, 2000; TOPÇU *et al*., 2004; VIEIRA *et al*., 2004; CARRALERO *et al*., 2006; TEMBE *et al*., 2007; KOCHANA *et al*., 2008a; KOCHANA *et al*., 2008b; ZEJLI *et al*., 2008). A tirosinase possui ampla distribuição na natureza, estando presente em vários seres vivos (SANCHEZ-FERRER *et al*.,1995). Esta enzima é capaz de catalisar a oxidação de fenóis utilizando apenas o oxigênio molecular como agente oxidante, gerando um produto que possui uma coloração escura – as quinonas (CESTARI *et al*., 2002; FATIBELLO - FILHO & VIEIRA, 2002; MARIN - ZAMORA *et al*., 2006).

Na literatura existente, encontram-se vários trabalhos utilizando a tirosinase presente no cogumelo *Agaricus bisporus*, material de estudo deste trabalho, como biocomponente na montagem de sensores enzimáticos (TOPÇU *et al*., 2004; MARIN - ZAMORA *et al*., 2006). No entanto, esta não foi utilizada na forma imobilizada naturalmente no tecido, isto é, imobilização *in natura*. Neste contexto, o presente trabalho visa estudar a possibilidade da utilização do tecido íntegro deste cogumelo, como fonte da enzima tirosinase, na confecção de um biossensor para fenol, não sendo, portanto, necessária a etapa de extração da enzima.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral desenvolver um biossensor amperométrico para detecção de fenol, utilizando o tecido fúngico dos corpos de frutificação de *Agaricus bisporus* como fonte da enzima tirosinase, atuando como biocomponente, e um eletrodo de oxigênio como transdutor.

2.2. Objetivos Específicos

As etapas descritas abaixo foram desenvolvidas com o intuito de se alcançar o objetivo geral desse trabalho, a saber:

2.2.2.1. Extração da tirosinase dos corpos de frutificação de *Agaricus bisporus*;

2.2.2.2. Medida da atividade enzimática presente no tecido fúngico;

2.2.2.3. Seleção das melhores condições de atuação da tirosinase naturalmente imobilizada no tecido fúngico na remoção de fenol de amostras-padrão líquidas no que diz respeito ao tamanho do pedaço do tecido; a temperatura e valor de pH da solução;

2.2.2.4. Estudo e quantificação da quantidade de fenol existente no próprio tecido fúngico;

2.2.2.5. Estudo da possível existência de biossorção no processo de remoção de fenol em amostras-padrão líquidas;

2.2.2.6. Seleção da quantidade de tecido fúngico e o tempo necessários para encontrar um menor desvio padrão nas respostas entre a correlação da concentração fenólica da amostra padrão de 10ppm e a variação de oxigênio (medido pelo eletrodo específico);

2.2.2.7. Estudos de estabilidade e reprodutibilidade do sistema biossensor, utilizando o transdutor (eletrodo de oxigênio) e o biocomponente (cogumelo).

CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Compostos Fenólicos

O fenol apresenta a fórmula química, C_6H_5OH, e quando puro é um sólido cristalino, possuindo odor característico e sabor adocicado. Ele é relativamente solúvel em água (9g/100g de água). Os compostos fenólicos são álcoois do tipo ROH, onde o R é um grupo benzênico (Figura 1). Os mais simples são líquidos ou sólidos de baixo ponto de fusão; a presença na sua estrutura química de ligações de hidrogênio intermoleculares faz com que apresentem pontos de ebulição bastante elevados. Eles se oxidam com muita facilidade, e se não estiverem purificados podem apresentar cor, devido simplesmente à presença de impurezas coradas. (KAMEDA, 2003).

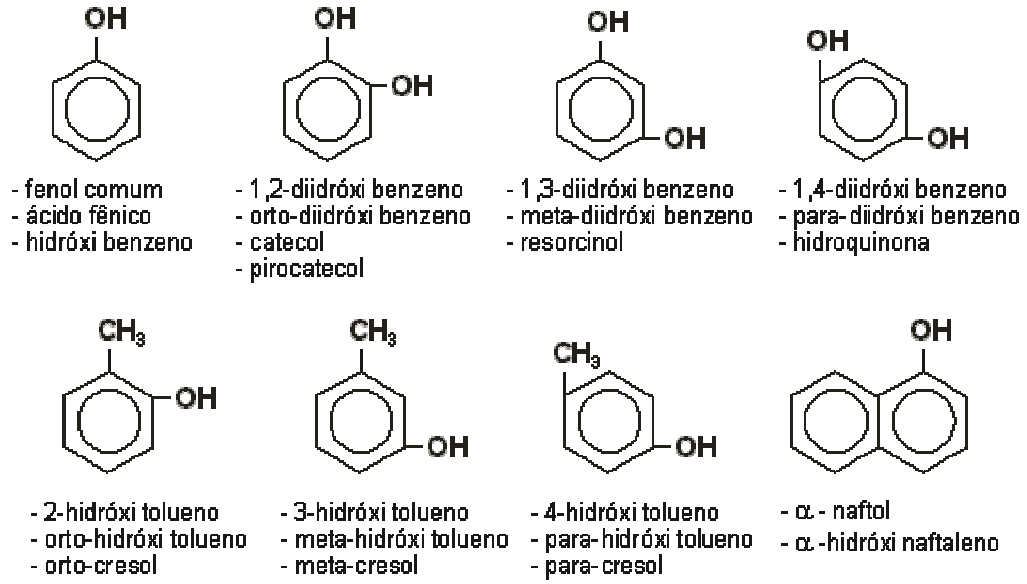

Figura 1: Estrutura química de alguns compostos fenólicos (http://images.google.com.br/).

O fenol é recuperado na indústria do carvão, além de uma quantidade considerável ser sintetizada. É utilizado extensivamente na síntese de produtos orgânicos, particularmente de resinas do tipo fenólicas (KAMEDA, 2003). Dentre seus diversos usos, pode-se citar: na agricultura onde é utilizado como biocida e na indústria de papel e celulose, utilizado no branqueamento da polpa.

Embora suas primeiras utilizações tenham sido como anti-séptico de feridas e em cirurgias, o fenol é um veneno protoplasmático que causa danos a todo tipo de célula. Os efeitos toxicológicos agudos do fenol são predominantemente sobre o sistema nervoso central e a morte pode ocorrer após uma hora e meia de exposição. O envenenamento agudo por esse composto pode causar distúrbios gastrointestinais severos, falha no sistema circulatório, anemia hemolítica, edema pulmonar e convulsões (MANAHAN, 1994; SANTOS DE ARAUJO *et al*., 2006). Devido ao seu potencial dano à saúde humana, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA classifica os fenóis em 11° lugar, no total de 126 poluentes, na sua lista de poluentes prioritários (FERNANDES, 2005). No Brasil, a fim de evitar danos à saúde humana, o Ministério da Saúde determinou que o limite máximo permitido de fenol em água destinada ao abastecimento público é de $0{,}1 \mu g.L^{-1}$. Além disso, a Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde impõe concentrações máximas, em águas de abastecimento, apenas para compostos derivados do fenol, tais como pentaclorofenol e 2,4,6 triclorofenol (SILVA *et al*., 2007).

A origem do fenol no meio ambiente é tanto natural como xenobiótica. As fontes naturais são oriundas da queima das florestas e demais tecidos vegetais, ocorrendo, portanto, naturalmente no solo (PASSOS, 2006). Já como fontes xenobióticas, isto é,

poluentes, os compostos fenólicos estão comumente presentes em efluentes industriais, oriundos das atividades de produção de plásticos, corantes, tintas, drogas, antioxidantes, pesticidas, detergentes e principalmente de papel. A quantidade e a qualidade dos efluentes variam muito de acordo com a tecnologia e os processos de produção empregados (ATLOW *et al*., 1984; ROSATTO, 2000; ROSATTO *et al*., 2001; FREIRE *et al*., 2002; LOUZADA *et al*., 2004; TPOÇU *et al*., 2004; ARAUJO *et al*., 2006).

O contexto de crescente preocupação com a degradação ambiental levou os governos a criarem leis que limitam os níveis de descarte para um número diverso de substâncias. No contexto brasileiro, a legislação federal estabelece um limite máximo diferenciado de fenóis totais em cada tipo de corpo d'água natural, limite este estabelecido pelo capítulo II da resolução CONAMA 357/05. Em relação às águas doces, a legislação permite uma concentração limite máxima de fenóis totais de 0,003mg/L, para corpos d'água de classe I e II, e 0,01mg/L, para aqueles de classe III. Em relação aos corpos de águas não-doces, o limite máximo de fenóis totais aceito é de 60μg/L (classes I e II de águas salinas) e 0,003mg/L (classes I e II para as águas salobras). Além disso, em relação ao descarte de efluentes em corpos hídricos, essa resolução impõe uma concentração máxima de 0,5mg/L de fenóis (CONAMA, 2005).

Devido à rigorosa imposição legal, além de serem substâncias tóxicas e claramente nocivas à saúde humana, o monitoramento ambiental constante e *in situ* é um problema prático importante. Por isso, é imprescindível que haja um crescente investimento no desenvolvimento de tecnologias capazes de realizar essa monitoração, como por exemplo, nos instrumentos biossensores. Neste contexto, a literatura tem mostrado o desenvolvimento de biossensores utilizando a enzima tirosinase, imobilizada

ou livre, como biocomponente para a detecção de fenóis (YILDIZ *et al.*, 2007; KOCHANA *et al.*, 2008a).

3.2. Tirosinase

3.2.1. Características Gerais

As polifenoloxidades (PFO) formam uma família de enzimas oxidorredutases capazes de catalisar a oxidação de compostos fenólicos, reagindo com o oxigênio sem a necessidade de co-substratos. Ela é dividida em duas subclasses: lacases e tirosinases (DURÁN & ESPOSITO, 2000).

As lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas que promovem a oxidação de vários substratos aromáticos com a simultânea redução do oxigênio em duas moléculas de água. Elas são capazes de catalisar a oxidação de compostos fenólicos a seus radicais livres aniônicos por mecanismo semelhante ao das peroxidases (KARAM & NICELL, 1997 *apud* BEVILAQUA, 2000). No entanto, são freqüentemente inativadas durante a reação devido a uma variedade de condições ambientais dos efluentes, como: inibidores, pH ou concentrações iônicas (COELHO & CAMMAROTA, 2001 *apud* KAMEDA 2003).

As tirosinases (polifenol oxidase; monofenol monoxigenase, catecol oxidase, EC 1.14.18.1) são enzimas que estão amplamente distribuídas na natureza, estando presentes ao longo de toda a escala filogenética desde as simples bactérias até os grandes mamíferos (FENOLL *et al.*, 2001). Estão diretamente ligadas à fase proximal

na cadeia da melanogênese e são responsáveis pelos fenômenos de pigmentação em mamíferos e de escurecimento em cortes vegetais (VAN GELDERY *et al.*, 1997). Isto é, essa enzima catalisa a oxidação da L-tirosina para seu correspondente dopaquinona. A polimerização do último resulta na formação da melanina (FARIA *et al*., 2007).

Vários trabalhos já foram publicados utilizando tirosinase obtida a partir de diferentes fontes - cogumelos, vegetais, frutas, legumes, além de epiderme de pós tumores e *Neurospora crassa* (ROS *et al.,* 1994; SEO *et al*., 2003; VIEIRA *et al*., 2004; KOCHANA *et al*., 2008a). Através desses estudos, observou-se que, independentemente da fonte, as tirosinases mantinham suas características funcionais e apresentavam estruturas semelhantes. O primeiro trabalho de investigação bioquímica com a tirosinase data de 1895, sendo realizado com o cogumelo *Russula nigrans,* cujos cortes expostos ao ar tornavam-se vermelhos e depois negros (SANCHEZ - FERRER *et al.,* 1995; FARIA, 2008). Em plantas e fungos, as tirosinases ocorrem em várias isoformas: formas imaturas, formas maturas e latentes e formas ativas. Sabe-se que existem estas isoformas, no entanto, não foi estabelecida a relação entre a descrição bioquímica e as características cinéticas destas (WHIICHERS *et al*., 1996). Segundo VAN GELDER *et al*. (1997), em cogumelos, aparentemente, 99% do total desta enzima estão presentes sob a sua forma latente. Além disso, BEVILAQUA (2000) observou que o envelhecimento do cogumelo deve ser responsável pela ativação destas formas latentes da tirosinase, visto que o extrato obtido de cogumelos envelhecidos apresentou um aumento de 48% na atividade enzimática em relação ao lote de cogumelos mais jovens (lote controle).

Assim, como ocorre com outras tirosinases macrofúngicas, a tirosinase de *Agaricus bisporus* é intracelular. Estudos sobre a estrutura da tirosinase desse cogumelo sugerem que a enzima possui um peso molecular de 110-120kDa e ocorre como um composto tetrâmero de duas subunidades de 43-48kDa (H) e duas subunidades de 13,4kDa (L), assumindo uma estrutura quaternária H_2L_2 (WICHERS *et al.,* 1996). Seu ponto isoelétrico (pI) situa-se em uma faixa de 4,7-5,0 e seu pH ótimo de atuação está entre 6 e 7 (SIGMA, 1998 *apud* BEVILAQUA, 2000). Em outros fungos, as estruturas quaternárias dessa enzima são diferentes, como por exemplo, em *Amanita muscaria*, a tirosinase apresenta-se na forma de heterodímero com massa molecular de aproximadamente 50kDa (MULLER *et al*., 1996 *apud* FARIA, 2008).

O grupo prostético da enzima, mostrado na Figura 2, possui estrutura semelhante ao da hemocianina, contendo dois átomos de cobre e sendo composto por dois sítios de ligação para aromáticos e um sítio de ligação para oxigênio que está relacionado aos átomos metálicos (BEVILAQUA, 2000).

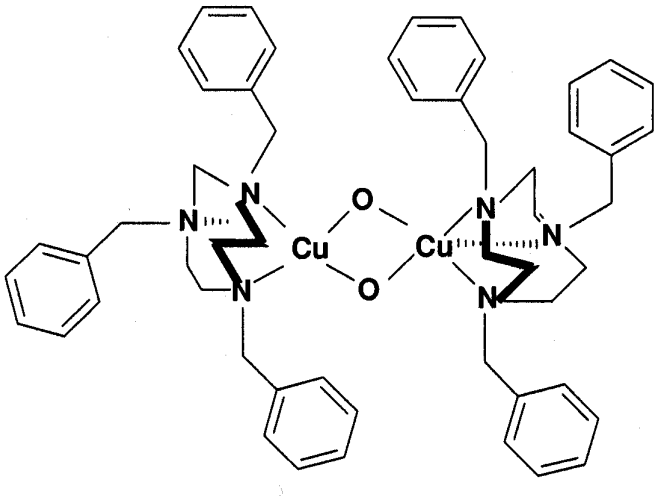

Figura 2: Esquema do grupo prostético da tirosinase (PRIMO, 2006).

O mecanismo cinético da tirosinase é bastante incomum. Ela, além de possuir dois tipos de atividade catalítica distintos (mono e difenolase), apresenta uma fase lag na reação com monofenóis. Vários fatores afetam o período desta fase: concentração de substrato, concentração de enzima, pH e a fonte da enzima (BEVILAQUA, 2000). A presença de quantidades catalíticas de difenóis ou íons metálicos de transição (principalmente Fe^{+2}, mas também Cd^{+2}, Ni^{+2}, Co^{+2} e Zn^{+2}) pode acabar com esta fase (SANCHEZ - FERRER *et al.,* 1995). No entanto, em relação à cinética da segunda reação, oxidação de difenóis, pode-se dizer que segue a cinética de Michaelis e Menten (FARIA, 2008).

Segundo COOKSEY *et al.,* (1997), existem dois mecanismos principais para explicar o sistema de auto-catálise dependente da presença do substrato difenólico, não havendo ainda um consenso na literatura a respeito do mecanismo cinético de atuação da enzima:

- Ativação alostérica: supõe a existência de pelo menos duas formas interconversíveis da enzima ou a presença de dois sítios ativos diferentes;
- Hipótese de recrutamento: depende da redução de um par de elétrons do sítio ativo pela oxidação de substratos de di-hidroxil, que poderia ocorrer direta ou indiretamente.

Durante a reação de oxidação de difenóis ocorre a inativação irreversível da tirosinase. Na literatura, este fenômeno é denominado por alguns autores de inativação suicida (ATLOW *et al.,* 1984; BURTON *et al.,* 1998). A inativação ocorre quando o produto da transformação catalisada por esta enzima reage com a mesma. Segundo ESCRIBANO *et al.* (1989, *apud* KAMEDA, 2003), durante a reação de oxidação de difenóis a o-quinonas ocorre a inativação irreversível da tirosinase por catecol. A inativação suicida da tirosinase também poderia ser resultado da reação de orto-quinonas com resíduos nucleofílicos próximos ao centro ativo da enzima. SANCHEZ-FERRER *et al.* (1995) consideraram mais plausível a hipótese da inativação por ataque de ligantes do cobre (radical hidroxil gerado durante a reação), pois a inativação da tirosinase ocorre mesmo na presença de agentes de redução que removam as quinonas.

A tirosinase utiliza oxigênio molecular para oxidar fenóis catalisando duas reações distintas: a orto-hidroxilação de monofenóis (atividade monofenolase, creolase) gerando catecóis e a oxidação de orto-difenóis a orto-quinonas (atividade difenolase, catecolase) (FENOLL *et al.*, 2001; ROSATTO *et al.,* 2001; CESTARI *et al*., 2002). As duas reações estão esquematizadas, de forma simplificada, na Figura 3 abaixo:

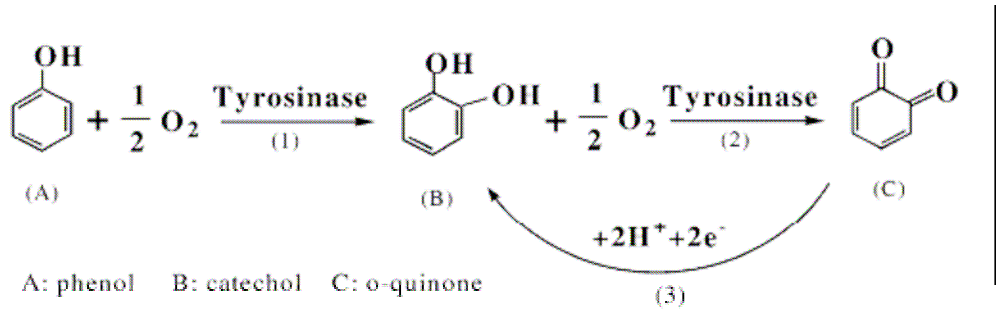

Figura 3: Esquema simplificado da reação catalisada pela enzima tirosinase, onde (1) representa a atividade cresolase e (2) a atividade catecolase (ZHANG *et al*., 2001).

Na Figura 4, tem-se uma descrição esquemática mais detalhada do funcionamento da enzima tirosinase. O ciclo1 representa a orto-hidroxilação de monofenol que apresenta quatro estados enzimáticos (E_{deoxy}, E_{oxy}, E_{oxy-M}, e E_{met-D}) antes de gerar o orto-difenol. Já o ciclo 2 representa a oxidação de orto-difenol a orto-quinonas, onde a enzima passa por cinco estados (E_{deoxy}, E_{oxy}, E_{oxy-D}, E_{met} e E_{met-D}). As orto-quinonas formadas são instáveis em soluções aquosas e reagem espontaneamente entre si formando oligômeros (FENOLL *et al*., 2001) que possuem coloração escura e, dependendo do substrato empregado na reação, precipitam após algum tempo. Vale ressaltar que a forma E_{met} é predominante *in vivo* (JOLLEY *et al*., 1974 *apud* FARIA *et al*., 2007).

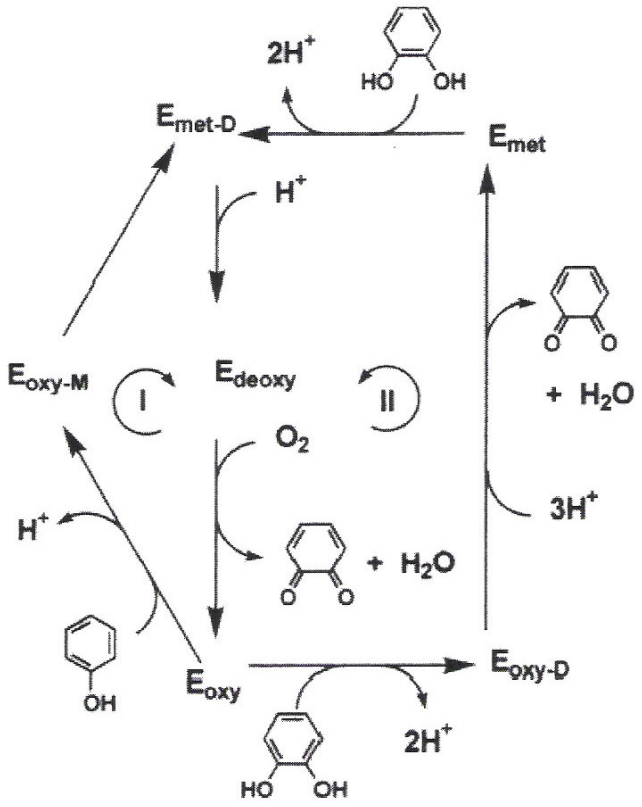

Figura 4: Funcionamento detalhado da enzima tirosinase, onde (I): hidroxilação de monofenóis e (II): dehidrogenação de *o*-difenóis a *o*-quinonas (SEO *et al*., 2003).

3.2.2. Aplicações da Tirosinase de Cogumelos

Os primeiros estudos sobre a enzima tirosinase presente em cogumelos foram motivados pelo desejo de entender o mecanismo de escurecimento enzimático de cogumelos ou os vegetais, na presença de ar, e evitá-lo (fato que reduz o valor de mercado do produto). No entanto, com o passar dos anos, o foco de estudo dessa enzima tem se voltado para seu uso em aplicações biotecnológicas e ambientais. As mais importantes aplicações da tirosinase são: o seu uso na biossíntese de L-DOPA**;** a detecção e a quantificação de compostos fenólicos em águas**;** a remoção de compostos

fenólicos de águas residuárias e a formação de redes de proteínas ligadas (c*ross-linked protein*) (FARIA, 2008).

Como componente biológico dos biossensores, as enzimas são as mais empregadas, sendo a tirosinase uma delas. A tirosinase presente no cogumelo *Agaricus bisporus*, material de estudo desse trabalho, tem sido estudada de diversas formas: extrato bruto (ATLOW *et al*., 1984; SEZGINTÛRK *et al*., 2005), purificada (PAPA *et al*., 1994; WHICHERS *et al*., 1996) e preparação comercial (ATLOW *et al*., 1984; COOKSEY *et al*., 1997; YILDIZ *et al*., 2007; SHAN *et al*., 2008).

A vantagem de utilizá-las deve-se ao fato de que estas são altamente específicas e seletivas. No entanto, apresentam uma estabilidade relativamente baixa, principalmente, no que diz respeito às variações reacionais (pH, temperatura, concentração de substrato, dentre outras). Neste sentido, os tecidos vegetal e fúngico íntegros surgem como excelentes fontes de enzima de baixo custo e, geralmente, mais estáveis que as enzimas purificadas. As enzimas naturalmente imobilizadas nas células destes materiais biológicos possuem, também, maior tempo de vida e normalmente apresentam o seu cofator disponível (ARNOLD & RECHNITZ, 1987).

3.3. Reino Fungi

O Reino Fungi, pertencente ao Domínio Eukaryota, é um grupo bastante heterogêneo formado por seres eucarióticos, podendo se apresentar sob a forma levuriforme, formar um pseudomicélio ou constituir hifas, formando um micélio

verdadeiro (SMIDERLE, 2008). Seus representantes são encontrados em todos os ambientes do planeta. Eles são conhecidos popularmente como bolores, mofos, cogumelos comestíveis e alucinógenos. São importantes decompositores e parasitas. Em relação à nutrição, são heterotróficos e se alimentam pela secreção de exoenzimas no substrato ao redor. As exoenzimas funcionam como as enzimas digestivas dos animais, hidrolisando moléculas orgânicas grandes no meio externo ao organismo (RAVEN *et aI.,* 2001).

Esse Reino é dividido em grupos menores, onde o filo Basidiomycota agrupa os seus representantes mais desenvolvidos. Os representantes desse filo, comumente conhecidos como basidiomicetos, constituem um grupo bastante diverso, sendo os cogumelos e orelhas-de-pau, as formas mais conhecidas. Eles apresentam, em sua maioria, uma frutificação macroscópica, constituída por hifas modificadas que formam pseudotecidos, os quais se diferenciam em píleo, estipe, lamelas, anel e volva (Figura 5) (SMIDERLE, 2008).

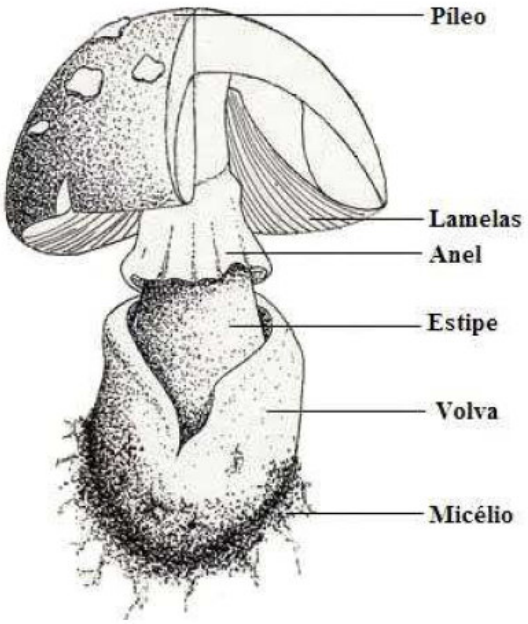

Figura 5: Esquema das principais estruturas de um cogumelo (SMIDERLE, 2008).

A importância atribuída a esse grupo está relacionada à utilização de seus representantes na alimentação e medicina popular desde tempos remotos (WASSER, 2002). O maior número das espécies comestíveis do filo Basidiomycota é enquadrado na ordem Agaricales, na qual há duas principais famílias: Boletaceae e Agaricaceae (SANTOS, 2005).

A familiarização com o consumo de basidiomicetos se tornou evidente quando se iniciou o cultivo de espécies de *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach (cogumelo champignon de Paris). Outra importância atribuída aos basidiomicetos refere-se à capacidade desses fungos em degradar celulose e lignina. Materiais orgânicos desperdiçados, como subprodutos agrícolas e resíduos animais, são utilizados como substrato para o cultivo de fungos, produzindo alimentos de boa qualidade, podendo ser

consumidos pelos humanos. Dessa maneira, os nutrientes são reciclados e retornam para a cadeia alimentar.

3.3.1. Macrofungo *Agaricus bisporus*

O cultivo do macrofungo *Agaricus bisporus* (champignon de Paris) foi iniciado na França casualmente. De acordo com BONONI *et al*. (1995 *apud* ROSA, 2007), em 1650 produtores de melão em Paris (França) notaram o crescimento de cogumelos sobre a cama (palha e esterco) utilizada no cultivo de melões. Em 1707, foi descoberto que cavernas apresentavam um ambiente favorável para o cultivo de champignon.

Em 1865, o champignon foi introduzido na América e passou a ser cultivado em instalações semelhantes a fábricas (estações de cultivo). No Brasil o cultivo foi introduzido em 1953 por imigrantes chineses na cidade de Mogi das Cruzes-SP e italianos em Atibaia - São Paulo (BONONI *et al*., 1995 *apud* ROSA, 2007). Atualmente, é cultivado, principalmente, nas regiões Sudeste e Sul do Brasil e é uma fonte rentável promissora dentro do agronegócio. O champignon de Paris é nutritivo, sendo rico em proteínas (2,69%), cálcio, ferro, cobre, zinco, vitamina C, folato e dezoito aminoácidos.

Dentro da classificação dos seres vivos, *Agaricus bisporus* (Figura 6) é classificado da seguinte maneira:

Reino: *Fungi*

Filo: *Basidiomycota*

Classe: *Basidiomycetes*

Ordem: *Agaricales*

Família: *Agaricaceae*

Gênero: *Agaricus*

Espécie: *Agaricus bisporus*

Figura 6: Imagem do corpo de frutificação de *Agaricus bisporus*.

3.4. Biossensores

3.4.1. Definição

Os biossensores envolvem uma área multidisciplinar para a qual não existe forma delineada. A rápida disseminação dos biossensores e sua diversidade podem

justificar as várias formas de definição de um biossensor que se encontram na literatura. De forma geral, os biossensores são definidos como qualquer dispositivo de detecção que incorpore tanto um organismo vivo ou produtos derivados de sistemas biológicos (enzimas, anticorpos, DNA, etc), como um transdutor que fornece a indicação, sinal ou outra forma de reconhecimento de uma substância específica no ambiente (PATACAS, 2007). De maneira mais específica, a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, 2001 *apud* SALGADO, 2001) propôs a definição de biossensor:

"Um biossensor é um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica, quantitativa ou semi-quantitativa através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que está em contato direto com o elemento de transdução".

Assim um biossensor combina a especificidade de um componente biológico ativo para o analito de interesse com a sensibilidade de um transdutor para converter o sinal biológico em um sinal quantificável; por exemplo, elétrico; proporcional à concentração do analito (SALGADO, 2001).

Os biossensores permitiram o desenvolvimento de uma família de técnicas eletroquímicas que oferecem rapidez e simplicidade. Este instrumento permite realizar as mais variadas tarefas como: efetuar controle em linha a nível industrial, análise ambiental em tempo real, automatização de análises bioquímicas, análise *in vivo*, detecção de substâncias biológicas relevantes (como hormônios e drogas de abuso) e detecção de agentes de guerra química. Geralmente um biossensor permite o uso de métodos "limpos" e de baixo custo sem a necessidade de pré-tratamentos morosos e de grandes volumes de amostra. O seu uso, na maioria dos casos, não necessita de técnicos

ou especialistas podendo em alguns casos dispensar o uso de reagentes, e aparecendo tanto como aparelhos de uso contínuo ou como descartáveis. Assim, um biossensor deve ser claramente diferenciado de um sistema bioanalítico que requer etapas adicionais de processamento, tais como adição de reagentes, e o componente biológico não está necessariamente ligado diretamente ao detector.

Portanto, os biossensores representam uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas analíticas existentes, devido as suas características únicas (ROSATTO *et al*., 2001), tais como:

- Seletividade, que está relacionada à habilidade que certas macromoléculas biológicas possuem em discriminar diferentes substratos;
- Faixa de sensibilidade, que corresponde à faixa de concentração mensurável;
- Acurácia e precisão;
- Natureza da solução, que está relacionada com condições como pH, temperatura e força iônica do meio as quais devem ser consideradas;
- Tempo, relacionado ao tempo de resposta; tempo de recuperação e tempo de vida útil;
- Freqüência de amostragem;
- Estabilidade operacional, onde a resposta do biossensor pode variar em função de diversos fatores como: geometria do sensor, método de preparo, assim como, receptores e transdutores usados. Depende da difusão externa e interna do substrato, e das condições operacionais de trabalho (concentração do analito, temperatura, pH, natureza do tampão, presença de solventes

orgânicos e de outras substâncias, e composição da solução matriz que contém a amostra);

- Reprodutibilidade, que é a medida da dispersão ou flutuação em uma série de medidas obtidas ao longo de um período de tempo para concentração de um analito dentro de uma faixa de utilização;
- Baixo custo de construção e estocagem;
- Pequeno tamanho e potencial para miniaturização que permite a sua fácil instalação no ambiente de medida e monitoração *in situ*.

3.4.2. Breve Histórico

A seletividade é um dos maiores problemas na química analítica, e geralmente, é obtida apenas através de um intenso controle das condições experimentais. No entanto, na natureza encontram-se "reagentes" altamente seletivos na forma de enzimas, anticorpos, dentre outros. As enzimas, particularmente, apresentam várias vantagens, em especial uma feliz combinação de seletividade com sensibilidade. Permitem ainda a utilização de várias tecnologias de transdução.

FREE & FREE (1953 *apud* PATACAS, 2007) revolucionaram os procedimentos analíticos com a implementação de tiras enzimáticas. No entanto, estas apresentavam diversos inconvenientes de modo que se procurou uma nova abordagem conseguida por CLARK & LYONS (1962 *apud* PATACAS, 2007) que prepararam o primeiro biossensor, propriamente dito, alterando um elétrodo de oxigênio e, subseqüentemente, modificando-o com recurso a enzimas.

A idéia foi testada em uma experiência usando glicose oxidase imobilizada na superfície de um elétrodo de oxigênio. Observou-se uma diminuição da concentração de oxigênio proporcional à concentração de glicose. No artigo correspondente, apareceu pela primeira vez o termo "eletrodo enzimático". Apesar disto, foram UPDIKE & HICKS (1966 *apud* PATACAS, 2007) que, extrapolando o conceito, resolveram os problemas de ordem prática, necessários para construir um elétrodo enzimático sensível a glicose.

O sensor foi à base de numerosas variações do seu desenho básico e, muitas outras enzimas (oxidases) foram imobilizadas. Assim, o desenho de Clark foi tão bem sucedido que muitos biossensores experimentais e, pelo menos um biossensor comercial, ainda são construídos segundo o original. No entanto, hoje em dia, prefere-se, como alternativa, a medição de peróxido de hidrogênio. Destes destacam-se os biossensores produzidos pela companhia *Yellow Springs Instrument Company* (Ysi; Ohio, EUA) (PATACAS, 2007). O seu biossensor de glicose foi criado em 1975, baseado na detecção amperométrica do peróxido de hidrogênio. Este foi o primeiro biossensor a ser produzido com fins comerciais.

O primeiro eletrodo enzimático potenciométrico foi construído por GUIBAULT & MONTALVO (1969 *apud* PATACAS, 2007). Tratava-se de um sensor de uréia baseado em urease imobilizada em um eletrodo de membrana seletiva a amônia.

Durante os anos 80, foi pela primeira vez atingido o sucesso econômico em grande escala. Em 1984, foi publicado um artigo sobre o uso de ferroceno e dos seus derivados como mediadores imobilizados para uso com oxidorredutases. Em 1987, estes eram componentes essenciais para a construção de eletrodos enzimáticos pouco

dispendiosos, e como tais, formaram a base para os primeiros elétrodos enzimáticos impressos em placas lançados pela companhia MediSense (Cambridge, EUA) (PATACAS, 2007).

As atuais publicações científicas contêm descrições de uma larga variedade de dispositivos que exploram as enzimas, ácidos nucléicos, anticorpos, células intactas e receptores celulares (material biológico) em combinação com transdutores eletroquímicos, ópticos, calorimétricos e acústicos (sistema de transdução). As mudanças no material biológico e/ou no sistema de transdução permitem milhares de estratégias alternativas de desenvolvimento de biossensores. Cada uma apresentando novas soluções para problemas analíticos nas mais variadas áreas de atuação.

3.4.3. Componentes e Funcionamento de um Biossensor

Uma característica dos biossensores que os diferencia dos sensores químicos é a especificidade da análise, isto é, a especificidade e a alta sensibilidade do componente biológico com o substrato de interesse. De um modo geral, como componentes usados no desenvolvimento de um biossensor, incluem-se:

- Componente biológico;
- Sistema de transdução;
- Sistema de processamento de dados e registro.

O componente biológico faz o reconhecimento da substância de interesse por meio de uma reação química gerando um sinal que pode resultar de uma variação na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança de estado de oxidação, etc. O transdutor converte este sinal em uma resposta mensurável, tais como: corrente, potencial, variação de temperatura, dentre outras. (PEREZ, 2000; SALGADO, 2001). A Figura 7 resume de forma clara o que foi supracitado.

A aplicação de um biossensor permite a detecção quantitativa de uma determinada espécie, pois este responde seletivamente e reversivelmente à espécie química, produzindo um sinal elétrico cuja intensidade depende da concentração da dita espécie.

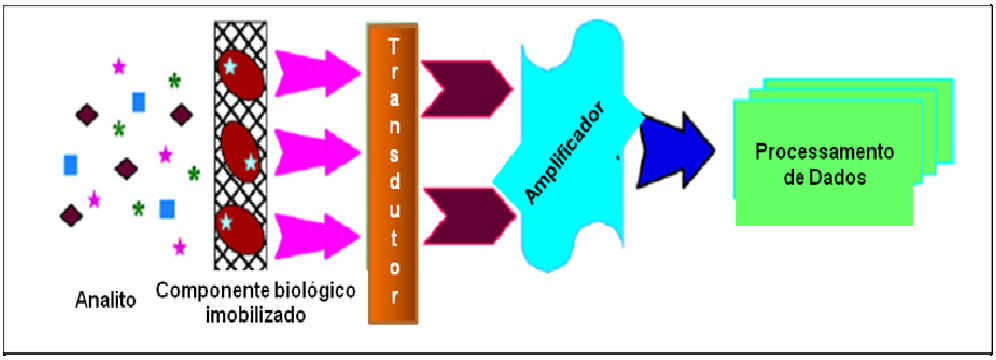

Figura 7: Esquema geral de funcionamento de um biossensor (MELO, 2008).

3.4.3.1. Componente Biológico

A seletividade, habilidade para discriminar um entre diferentes substratos, que é uma das características mais importantes de um biossensor, é função principalmente do componente biológico, embora algumas vezes o transdutor também contribua para a

seletividade. Por isso, enzimas foram e continuam sendo o elemento biológico mais usado na construção de biossensores (DU *et al.*, 2008; ALFAYA & KUBOTA, 2008).

Alguns requisitos básicos são exigidos na escolha de um biocomposto para atuar como elemento de reconhecimento biológico, dentre eles (SALGADO, 2001):

- Disponibilidade de um sítio reativo que posso reagir/interagir com o analito;
- Estabilidade face ao meio e as condições de medição;
- Possibilidade de modificação / imobilização sobre suporte por métodos químicos sem afetar o seu desempenho.

Baseado nestas exigências, alguns biocompostos são adequados para o uso na composição dos biossensores, entre eles: enzimas, cofatores, receptores, anticorpos, células de microorganismos, organelas e tecidos vegetais e animais. Assim, de acordo com o elemento biológico utilizado para a sua construção, os biossensores podem ser divididos em várias classes (Figura 8). Dentre elas, as classes mais desenvolvidas são: biossensores enzimáticos, microbiológicos, os quimioreceptores e os imunossensores.

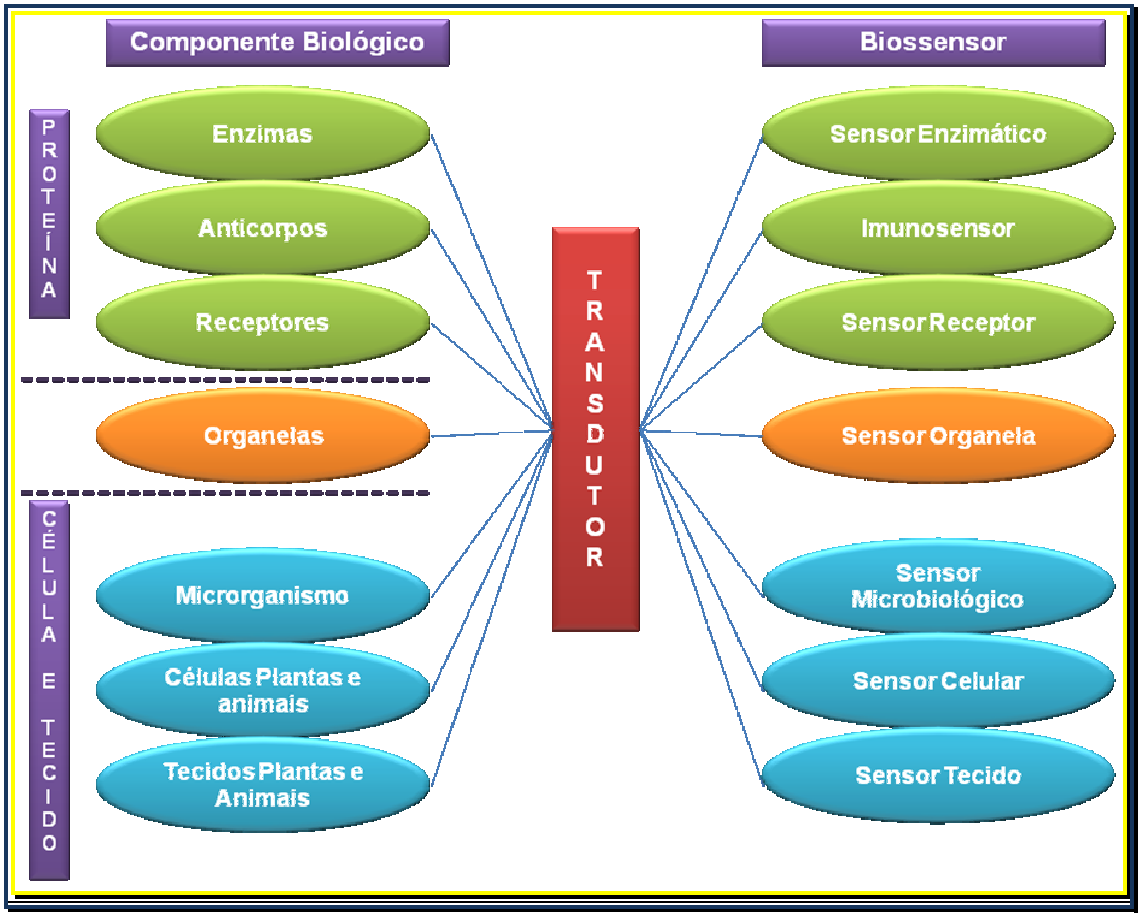

Figura 8: Classificação dos biossensores de acordo com o elemento biológico sensível (MELO, 2008).

3.4.3.1.1. Biossensores Enzimáticos

A maior parte dos biossensores desenvolvidos utiliza como componente biológico as enzimas, em geral imobilizadas (KARUBE & NOMURA, 2000). A vantagem do uso deste componente é que as enzimas são catalisadores biológicos altamente específicos e seletivos. Comparadas aos catalisadores químicos, elas apresentam um alto nível de especificidade com o substrato, devido principalmente à ligação forte da molécula de substrato pelo seu sitio ativo, envolvendo fatores do meio

ambiente reacional, tais como: tamanho da molécula substrato, polaridade, estereoquímica, grupos funcionais ligados e relativa energia de ligação.

A maior desvantagem em relação ao uso de enzimas na construção de um biossensor é o fato de apresentarem uma estabilidade relativamente baixa, principalmente no que diz respeito à variação das condições físico-químicas do meio reacional, mas que pode ser contornada usando as condições adequadas de pH, temperatura e pressão que garantam a manutenção da atividade enzimática. Outra desvantagem é o fato das enzimas serem caras e, algumas reações enzimáticas, requererem co-fatores que se não foram facilmente regenerados, encarecem mais ainda o uso de biossensores enzimáticos.

Na literatura encontram-se vários trabalhos que utilizam uma ou mais enzimas como componente biológico do biossensor (WANG & CHEN, 1995 *apud* ROSATTO *et al*., 2001; VIEIRA *et al*., 2003; LOUZADA *et al*., 2004).

3.4.3.1.2. Biossensores Microbiológicos

Os biossensores microbiológicos são formados por um microrganismo (estrutura celular intacta) imobilizado, sensível e que especificamente reconhece a espécie de interesse, interligado a um adequado sistema de transdução. O princípio de funcionamento dessa classe de biossensores envolve assimilação do composto orgânico pelo microrganismo, acompanhada por uma variação na atividade respiratória ou na produção de metabólitos (atividade metabólica) (H_2, CO_2, NH_3, como exemplos), que são monitorados diretamente por um transdutor. Estes metabólitos podem ser

monitorados por transdutor eletroquímico, caso sejam eletroativos ou por transdutor ótico, caso promovam variação colorimétrica no meio reacional.

Os biossensores microbiológicos apresentam algumas vantagens em relação aos enzimáticos, como: serem menos sensíveis a variações físico-químicas do meio (pH, temperatura, pressão), podem ser regenerados pela simples imersão dos mesmos em meio de crescimento, são mais baratos e, apresentam maior tempo de vida. No entanto, apresentam a desvantagem de terem um longo tempo de resposta e serem menos seletivos quando comparado aos enzimáticos.

A maior aplicação dos biossensores microbiológicos está na detecção da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) na análise de efluentes (D'SOUZA, 2001). Outra aplicação ambiental bastante utilizada é o teste de toxicidade microbiana utilizando o comercialmente disponível Microtox™ (*AZUR Environmental*). Ele utiliza bactérias luminescentes e a diminuição da luz emitida por elas está relacionada à toxicidade do composto em estudo.

3.4.3.1.3. Biossensores que usam tecidos animais e vegetais

O Brasil tem uma grande variedade de vegetais que podem se constituir em fontes inesgotáveis de enzimas para serem aplicadas nas mais diversas áreas do conhecimento. Em química analítica, por exemplo, o tecido vegetal pode ser utilizado na construção de diversos tipos de biossensores e/ou procedimentos enzimáticos de análise. Há uma tendência recente de utilização de tecidos vegetais e/ou extratos brutos no lugar de enzimas purificadas na confecção dos biossensores.

O uso de tecidos vegetais e/ou extratos brutos pode apresentar, em alguns casos, certa desvantagem na seletividade do método analítico, no entanto, são extremamente econômicos e, geralmente, possuem tempo de vida superior àqueles métodos que utilizam enzimas purificadas. Essa estabilidade se deve ao fato das enzimas estarem em seu *habitat* natural, isto é, estarem naturalmente imobilizadas nas células do material biológico (ARNOLD & RECHNITY, 1987). Outra desvantagem é que os biossensores de tecido estão sujeitos a um grande número de interferências e contaminações.

Há diversas formas de se aplicar o tecido vegetal na confecção dos biossensores. A mais citada na literatura envolve a obtenção de extratos brutos enzimáticos a partir do tecido vegetal (MATSUMOTO *et al*., 1981; SIGNORI & FATIBELLO-FILHO, 1994; VIEIRA & FATIBELLO-FILHO, 2002; TOPÇU *et al*., 2004). No entanto, o ideal seria a utilização do tecido íntegro, não havendo necessidade de extrair a enzima, garantindo uma fonte barata, onde o tecido pode ser usado na forma de fatia do material biológico descascado (FERNANDES *et al*, 1996 *apud* FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2002; BOTRÉ *et al*, 1991 *apud* FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2002; HOIRE & RECHNITZ, 1995), *in natura*, previamente liofilizado ou desidratado (KURIYAMA & RECHNITZ, 1981 *apud* FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2002; PINTO *et al*., 2007).

A tendência de escurecimento dos tecidos vegetais está relacionada com as reações entre a enzima polifenol oxidase ou peroxidase e os substratos naturais presentes nestes tecidos. Este processo aliado à oxidação promovida pelo oxigênio são os responsáveis pelo decréscimo da atividade enzimática dos extratos brutos (SALGADO, 2001). Com o objetivo de minimizar estes efeitos, diversas substâncias protetoras e/ou estabilizadoras, como Polyclar (Super R, K-30, 10, AT, SB-100) são

utilizadas (VIEIRA *et al.*, 2003), sendo que a última é responsável por manter a maior atividade específica quando usada na proporção de 2,5 : 25 (Polyclar SB-100 : tecido vegetal) (SALGADO, 2001).

A Tabela 1 aponta algumas aplicações de tecidos animais e vegetais como componentes biológicos de biossensores.

Tabela 1: Aplicações de tecidos animais e vegetais em biossensores.

Substrato	Tecido biocatalisador	Transdutor eletroquímico
Glutamina	Células de rim suíno	Sensor de NH_3
Adenosina	Células da mucosa do intestino delgado de rato	Sensor de NH_3
Guanina	Fígado de coelho	Sensor de NH_3
Peróxido de hidrogênio	Fígado bovino	Sensor de O_2
Piruvato	Semente de milho	Sensor de CO_2
Dopamina	Polpa de banana	Sensor de O_2
Cisteína	Folha de pepino	Sensor de NH_3
Tirosina	Beterraba	Sensor de O_2
[*1] Uréia	Feijão de porco triturado	Sensor de NH_3

Fonte: SALGADO, 2001 modificado.

Onde: [*1] PINTO *et al*, 2007.

O presente trabalho se insere nesta categoria quando a classificação se baseia no material biológico, visto que utiliza como biocomponente, o tecido fúngico íntegro do macrofungo de *Agaricus bisporus* para detecção de fenol.

A maior parte dos trabalhos com biossensores para compostos fenólicos, baseiam-se na utilização de enzimas polifenol oxidases, como a tirosinase, compradas comercialmente e/ou extratos brutos enzimáticos de tecidos vegetais imobilizados em

várias matrizes como glutaraldeído (TOPÇU *et al*., 2004), agarose, quitosana (ABDULLAH *et al*., 2006; OLIVEIRA & VIEIRA, 2006), PVA (KIM *et al*., 2007; ZEJLI *et al*., 2008), poliamida, e sistemas de adsorção física em eletrodos como platina, carbono vítreo (TEMBE *et al*., 2007; SHAN *et al*., 2008), dentre outros. Em relação ao material de estudo do presente trabalho, *Agaricus bisporus*, a tirosinase presente no seu tecido, normalmente, é utilizada, como biocomponente de biossensores, extraída dos cogumelos e/ou em extrato bruto imobilizado (FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2002).

Além de compostos fenólicos, o tecido fúngico de *A. bisporus* também tem sido utilizado para deteção de demais compostos, como tiouréia (SEZGINTÜRK & DINÇKAYA, 2008), álcool etílico (AKYILMAZ & DINÇKAYA, 2000; HUANG & WU, 2006), ácido benzóico (SEZGINTÜRK *et al.*, 2005). Neste último caso, SEZGINTÜRK *et al.* (2005) desenvolveram um biossensor para detecção de ácido benzóico. Utilizaram a tirosinase do tecido de *Agaricus bisporus* homogeneizado imobilizada em gelatina e glutaraldeído na proporção de 44,25mg/cm^2, 5,9mg/cm^2 e 2,5%, respectivamente sob eletrodo de oxigênio do tipo Clark.

3.4.3.1.4. Imunossensores

Os imunossensores utilizam proteínas globulares de soro (tais como imunoglobulinas – anticorpos, Ac) que formam parte de um importante grupo de proteínas altamente específicas. Anticorpos ligam-se à substâncias particulares (antígenos, Ag) com alta especificidade e afinidade. Dentre os anticorpos utilizados, podem ser citados: anticorpos policlonais e monoclonais; fragmentos de anticorpos;

conjugados anticorpo-enzima e anticorpos marcados. O principal problema deste biossensor é o elevado peso molecular dos anticorpos que dificulta a sua adaptação ao transdutor (SALGADO, 2001). A maior parte dos imunossensores desenvolvidos é usada nas áreas clínica e médica, visando rápidas determinações de células tumorais, microorganismos patogênicos, toxinas e substâncias no sangue.

3.4.3.1.5. Biossensores Quimioreceptores

Os biossensores quimioreceptores utilizam como componentes biológicos biomoléculas que agem como intermediários nas vias metabólicas (proteínas que interagem com espécies químicas, tais como hormônios, lipídeos, moléculas de DNA, resultando em variações conformacionais) (SALGADO, 2001) ou biomoléculas que apresentam propriedades neurais (sentidos de base química, como olfato e paladar).

Em geral, esses biossensores quimioreceptores apresentam problemas de ligação ao transdutor, devido a sua fragilidade; dificuldade de manipulação e um tempo de vida curto dos seus componentes biológicos (SALGADO, 2001).

A Tabela 2 resume o que foi supracitado sobre as diversas classes de biossensores agrupados de acordo com o seu componente biológico.

Tabela 2: Comparação entre os componentes biológicos usados em biossensores, mostrando suas vantagens e desvantagens.

Componente Biológico	Vantagens	Desvantagens
Biocatalisadores		
Enzimas	Alta seletividade e atividade	Estabilidade limitada
Seqüência de Enzimas	Expansão da acessibilidade	Sujeito a interferências, condições de operação restritas
Microorganismos	Grande variedade, possibilidade de regeneração, sistema fechado	Pobre seletividade, limitado tempo de vida
Tecidos de plantas e animais	Alta atividade, configuração natural	Sujeitos as interferências e contaminações
Quimioreceptores		
Estruturas intactas	Uso das estruturas naturais que fornecem ótimos estados para detecção	Tempo de vida limitado, frágeis
Preparações contendo os quimioreceptores isolados	Podem ser preparadas de modo a manter altas estabilidades e mais resistências	Dificuldades para estocagem, poucos tipos disponíveis, limitada seletividade
Imunossensores		
Anticorpos Policlonais	Relativamente baratos	Apresentam várias constantes de ligação, limitada seletividade
Anticorpos Monoclonais	Boa seletividade, uniforme	Alto custo, disponibilidade limitada
Fragmentos de anticorpos	Baixo peso molecular	Disponibilidade limitada, custo incerto
Conjugado enzima-anticorpo	Alta amplificação do sinal	Difícil preparo

Fonte: THEVÉNOT *et al*., 2001 modificado.

3.4.3.2. Sistema de Transdução

De uma forma genérica, define-se transdutor como sendo todo dispositivo que transforma uma forma de energia a outra forma de energia. No âmbito da instrumentação elétrica, define-se transdutor como sendo todo equipamento que

converte qualquer grandeza física não elétrica (temperatura, som, luz, como exemplos) em um sinal elétrico. Sob o ponto de vista da confecção de um biossensor, transdutor é o equipamento que converte o produto da reação biológica em um sinal elétrico quantificável e processável. O papel deste equipamento consiste em detectar a presença, a mudança, a amplitude ou a freqüência de uma grandeza submetida à medição e providenciar na saída um sinal elétrico que, quando convenientemente processado e aplicado a um aparelho de medição, seja possível quantificar o elemento medido.

A combinação das mais variadas áreas, como eletroquímica, física, eletrônica, tecnologia de sistemas integrados de silício e de fibras óticas no desenvolvimento de novos transdutores, aliada à bioquímica e imunoquímica, tem tornado possível o surgimento de micro-biossensores altamente sensíveis, específicos, seletivos e acurados.

A escolha do transdutor é realizada mediante três requisitos básicos: que ele seja adequado para adaptação ao material biológico imobilizado; que seja altamente específico para o analito de interesse, sendo capaz de detectar alguma variação específica que ocorra durante a reação biológica e; que esta variação ocorra na faixa de concentração apropriada (BARKER, 1971 *apud* SALGADO, 2001; MELLO & KUBOTA, 2007). Outros aspectos também devem ser atendidos, como: freqüência da resposta; compatibilidade com o meio ambiente onde tem que operar; exatidão; características elétricas (relação entre sinal e ruído; possibilidade de amplificação do sinal quando insuficiente; limitações da freqüência de resposta) e condições de aplicação e robustez (peso, dimensões, robustez mecânica e elétrica).

Além da classificação de acordo com o seu componente biológico, os biossensores podem ser classificados de acordo com o seu sistema de transdução. Baseado no transdutor, os biossensores podem ser classificados em:

- Biossensores Eletroquímicos:
  - Biossensores Amperométricos;
  - Biossensores Potenciométricos;
  - Biossensores Condutimétricos;
- Biossensores Acústicos;
- Biossensores Óticos;
- Biossensores Calorimétricos.

Dos vários transdutores empregados na construção dos biossensores, os mais utilizados são os eletroquímicos, óticos e calorimétricos. Na Tabela 3, encontram-se os vários sistemas de transdução, seus modos de medição e aplicação típica (MASCINI *et al.*, 2001 *apud* SALGADO, 2001).

Tabela 3: Tipo de transdutores empregados em biossensores.

Sistemas de Transdução	Modo de medida	Aplicações típicas
Eletroquímicos		
Condutimétrico	Condutância	Reações catalisadas por enzimas
Amperométrico	Corrente	Substratos enzimáticos e sistemas imunológicos (antígeno/anticorpo)
Potenciométrico: FET (Transistores de Efeito de Campo) ISE (Eletrodo Íons Seletivos)	Voltagem	Íons, gases, substratos enzimáticos e analitos imunológicos Íons em meio biológico, eletrodos enzimáticos e imunoeletrodos
Impedimétrico	Impedância	Imunossensores enzimáticos
Acústicos		
Cristais piezoelétricos, equipamentos de superfície acústica	Variação de massa	Gases voláteis, vapores e analitos imunológicos
Óticos		
Optoeletrônicos, fibras óticas, equipamento de ondas guiadas	Variação de luminosidade (luminescência, fluorescência), Índice de refração	pH, substratos enzimáticos, analitos imunológicos
Calorimétricos		
Termistores, diodos	Calor	Enzima, organela, células integras ou tecidos, gases, poluentes, antibióticos, vitaminas, analitos imunológicos

Fonte: MASCINI *et al.*, 2001 *apud* SALGADO, 2001 modificado.

3.4.3.2.1. Biossensores Eletroquímicos

Essa classe de biossensores se caracteriza por: serem, simples, sensíveis, confiáveis e de resposta rápida; necessitarem de instrumentação de baixo custo;

operarem em condições em que não é necessário um pré-tratamento da amostra e permitirem efetuar determinações em uma ampla faixa de concentração.

As técnicas eletroanalíticas são capazes de fornecer limites de detecção excepcionalmente baixos e uma abundância de informações que caracterizam e descrevem eletroquimicamente determinados sistemas, sempre se baseando nas propriedades elétricas de uma solução de analito quando ele está em contato com uma célula eletroquímica. Tais informações incluem: a estequiometria e a velocidade de transferência de carga interfacial; a velocidade de transferência de massa; a extensão de adsorção e de quimissorção e as velocidades e constantes de equilíbrio de reações químicas. Uma vantagem deste método é que as células eletroquímicas são freqüentemente específicas para um estado de oxidação particular e sua instrumentação é relativamente barata. Todas estas vantagens fazem com que os biossensores eletroquímicos constituam a grande maioria dos biossensores desenvolvidos (CASTILHO, 2003 *apud* MELO, 2008).

Dependendo do princípio de medição, os biossensores eletroquímicos podem ser subdivididos em: amperométricos, potenciométricos e condutimétricos. Neste trabalho, somente serão descritos de forma mais abrangente os transdutores amperométricos por estes serem nosso objeto de estudo e aplicação.

3.4.3.2.1.1. Biossensores Amperométricos

O princípio de funcionamento de um biossensor amperométrico é a medida da corrente produzida por uma reação química entre espécies eletroativas. Esta reação

ocorre num potencial determinado e a corrente gerada está relacionada com a espécie em solução. Assim estes biossensores dependem tipicamente de um sistema biológico que converta cataliticamente analitos inativos eletroquimicamente em produtos que possam ser oxidados ou reduzidos em um eletrodo operante, o qual é mantido em um potencial específico de acordo com um eletrodo de referência. A corrente produzida pela reação redox é linearmente proporcional à concentração do produto eletroativo, a qual é proporcional ao analito (substrato da enzima) não eletroativo.

Todavia, como estes biossensores são operados por difusão, as principais desvantagens apresentadas por eles são: uma faixa dinâmica pequena devido à cinética de saturação da enzima; os potenciais relativamente elevados podem oxidar espécies diferentes do composto de interesse e a corrente pode ser afetada pela velocidade com a qual o analito difunde até a superfície do eletrodo. Algumas inovações têm tentado superar estes problemas, como o uso de membranas limitantes de difusão para manter as concentrações de substrato abaixo dos níveis de saturação da enzima e o uso de mediadores (PEREZ, 2000).

A construção de eletrodos quimicamente modificados através do desenvolvimento de técnicas de imobilização tanto das enzimas como dos mediadores fez surgir uma nova classe de transdutores amperométricos. Os mediadores podem ser incorporados aos eletrodos por adsorção, oclusão em filmes poliméricos, ligação covalente ou simplesmente misturados em pasta de carbono (ROMANI *et al*., 2000). PANDEY *et al*. (1993 *apud* FERNANDES, 2005) desenvolveram um biossensor para medição da glicose, onde a enzima glicose oxidase estava incorporada a uma pasta de

grafite e epóxi modificada e material eletroativo (mediador) tetracianoquinodimetano (TCNQ). A mistura pastosa obtida era usada para preencher o corpo de um eletrodo ligante. Esta tecnologia é conhecida como screen printing.

Este tipo de biossensor representa a maioria dos dispositivos comerciais disponíveis atualmente, isto porque estes eletrodos são baseados em enzimas redox (oxiredutases) (SIGNORI & FATIBELLO-FILHO, 1994) e existem um grande número destas enzimas comercialmente disponíveis que podem atuar em ácidos graxos, açúcares, aminoácidos, aldeídos e fenóis.

A Tabela 4 apresenta alguns biossensores amperométricos para a análise de compostos fenólicos.

Tabela 4: Biossensores amperométricos para análise de compostos fenólicos a base de tecidos e célula.

Tecido/célula	Enzima(s)	Analito	E *vs* Ag/AgCl (pH)
Cogumelo	tirosinase	Fenol (0,16-15 ppm)	-0,2 V (7,5)
Banana	Polifenol oxidase	Dopamina (5-90 μM), Catecol, L-dopa, epinefrina, hidroquinona	-0,2 V (7,4)
Banana ou Cogumelo	polifenol oxidase ou tirosinase	Dopamina (0,4-10 μM), L-dopa, Norepinefrina	+0,1 V (7,4)
Banana	Polifenol oxidase	Dopamina, epinefrina, Norepinefrina	-0,2 V (4,5)
Cogumelo	tirosinase	Fenol, p-cresol, p-clorofenol	-0,2 V (5,0)
Beringela	Polifenol oxidase	Dopamina (50-250 μM) L-dopa (100-600 μM) Catecol (5-45 μM)	0,2 V -(7,0)
Espinafre	Catecol oxidase	Dopamina (2-160 μM), L-dopa, norepinefrina	-0,2 V (8)
Espinafre	Polifenol oxidase	Dopamina (50 mM-?)	-0,2 V (7,4)

Composição dos eletrodos: grafite em pó e óleo mineral

Fonte: ROSATTO, 2000.

3.4.3.2.1.1.1. Transdutor de estudo: Eletrodo de oxigênio

Biossensores baseados em transdutores eletroquímicos são os mais comuns e mais freqüentemente citados na literatura. A amperometria é a técnica eletroquímica geralmente aplicada em biossensores disponíveis comercialmente. É uma técnica eletroquímica que tira vantagem do fato de certas espécies químicas serem oxidadas ou reduzidas em eletrodos de metais inertes quando se aplica um potencial constante. Essas espécies químicas são conhecidas como substâncias eletroativas. Três eletrodos compreendem uma célula amperométrica. O eletrodo de trabalho é geralmente constituído de um metal como platina, carbono vítreo ou ouro (D'ORAZIO, 2003).

Em 1962, o professor Liland Clark desenvolveu o primeiro sensor enzimático para glicose (eletrodo de Clark) que consistia de um sistema de dois eletrodos separados da solução da amostra por uma membrana gás permeável. Assim sendo, atualmente, os sensores de gases amperométricos representados pelo sensor de oxigênio tipo Clark para determinação de oxigênio em uma variedade de ambientes líquidos (PORRAS, 1996).

O eletrodo de oxigênio consiste de um catodo e de um anodo condutivamente conectados por um eletrólito. Uma tensão adequada de polarização entre o catodo e o anodo reduz o oxigênio no catodo. A tensão é selecionada de modo que o oxigênio seja completamente reduzido, sendo que os demais gases não são afetados. A tensão ideal para o sistema Pt/Ag/AgCl encontra-se entre –500 e –750mV.

Reação catodo: $O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^-$

Reação anodo: $4Ag + 4Cl^- \rightarrow 4AgCl + 4e^-$

Tais reações químicas resultam em uma corrente elétrica que é proporcional à pressão parcial de oxigênio (pO_2). O eletrodo de oxigênio consome o oxigênio que é continuamente extraído da solução. A vazão e a viscosidade da solução são, portanto, parâmetros importantes.

O oxigênio se difunde através da membrana e é reduzido em um eletrodo de platina catodicamente contra um eletrodo de referência (Ag/AgCl) Um eletrodo de trabalho (platina) é separado de um eletrodo de referência (Ag/AgCl) por um material isolante e, ambos, imersos numa solução concentrada de KCl. É mantida uma diferença de potencial (ddp) constante entre os dois eletrodos por meio de polarização catódica do eletrodo de trabalho. A solução, o catodo e o anodo são separados do meio que contém o analito por uma membrana permeável ao oxigênio (FERNANDES, 2005).

Considerando-se que a difusão através da membrana é o processo controlador da passagem de oxigênio do analito para a superfície do catodo, a corrente resultante é diretamente proporcional à concentração (pressão parcial) de oxigênio na amostra. Como a platina é um agente catalisador da dissociação e redução covalente da água, elétrons saem do eletrodo de Pt, combinando-se com moléculas dissociadas de O_2 e íons de hidrogênio, formando água (FERNANDES, 2005).

A taxa com a qual os elétrons saem do eletrodo é proporcional à concentração de O_2 disponível para capturá-los. A corrente flui do eletrodo de Ag para o eletrodo de Pt quando os elétrons saem deste para a solução. A retirada de elétrons do eletrodo de prata produz íons de prata os quais estão em baixa concentração se comparados com os íons cloreto, na solução. Esses íons de prata se combinam com os de cloreto, formando um acúmulo de cloreto de prata na superfície do eletrodo de prata, deixando íons de

potássio para trás, porém, como íons de hidrogênio são retirados da solução pelo consumo de oxigênio, o sistema é eletrostaticamente neutro (FERNANDES, 2005).

A quantidade de oxigênio dissolvido e a magnitude da corrente do eletrodo são influenciadas pelos seguintes parâmetros: pressão parcial do oxigênio da solução; material e espessura da membrana; tamanho do catodo; tensão de polarização; temperatura e condições de vazão na solução.

Na literatura, existem diversos trabalhos que descrevem o desenvolvimento de biossensores que utilizam o eletrodo de oxigênio como transdutor na detecção e monitoração de diversos analitos, como: glicose, compostos fenólicos (TIMUR *et al*., 2004) e etanol (AKYILMAZ & DINCKAYA, 2000; HUANG & WU, 2006).

3.4.4. Aplicação dos Biossensores

A capacidade dos biossensores em determinar de forma seletiva analitos em amostras complexas, apresentarem rapidez de análise, diminuírem custo e resíduos gerados por análise, tem atraído o interesse de diferentes áreas como: diagnose clínica, militar, controle de processos, indústrias de alimentos e bebidas, agricultura e monitoramento ambiental. Dentre estas, a área que mais vem se desenvolvendo na criação e também na comercialização destes instrumentos é a área médica.

Na área médica é de extrema importância a determinação de gases, íons ou metabólitos, como glicose no sangue, pois os pacientes que requerem uma terapia intensiva freqüentemente mostram rápidas variações nos níveis bioquímicos destes

componentes, e isto, muitas vezes, requer uma ação urgente e apropriada. A aplicação dos biossensores permitiu que este monitoramento fosse realizado de forma efetiva, rápida e segura garantindo um tratamento imediato do paciente em condições críticas, como no caso dos pacientes diabéticos, onde o sensor miniaturizado é implantado como parte da regulação do equipamento de infusão de insulina.

Outra aplicação importante nesta área consiste em descobrir rapidamente enfermidades raras em grupos populacionais. A fabricação de sensores híbridos com DNA em sua composição permite detectar como compostos estranhos (metais, substâncias orgânicas sintéticas) produzidos pela industrialização podem afetar o material genético e causar enfermidades em organismos vivos. Ao detectar variação na cadeia de DNA de um indivíduo, poderia ser aplicada uma medida preventiva e, em muitos casos, conseguir a cura através de diagnósticos precoces.

A área de diagnose clínica já possui alguns biossensores amperométricos que usam enzimas imobilizadas sendo comercializados, como é o caso dos sensores de glicose, lactato, etanol, lactose, galactose, sacarose e colesterol (ARYA *et al.*,2008) todos fabricados pela *Yellow Spring Instruments* e sensores de ácido úrico fabricados pela *Fuji Electric*. Estes fabricantes garantem a determinação quantitativa de substâncias simples presentes em amostras complexas de forma acurada, precisa e barata em um tempo de análise de aproximadamente 2 minutos.

Na área militar, os estudos sobre biossensores são mantidos em sigilo e envolvem a detecção de gases tóxicos, explosivos, agentes patogênicos e toxinas, onde os requisitos exigidos para um biossensor que atue nesta área são: durabilidade frente às

intempéries, facilidade de operação e operação contínua e remota com alta confiabilidade e sensibilidade (SALGADO, 2001).

Os biossensores aplicados ao monitoramento e controle de bioprocessos oferecem inúmeras vantagens como seletividade e resposta rápida, comparado a outros métodos. No entanto, em função de suas principais desvantagens: a maior parte não pode ser esterilizada devido à alta sensibilidade do componente biológico; funcionam em uma faixa limitada de concentração e re-calibrações e substituição dos componentes biológicos podem ser necessárias, são hoje pouco usados nas indústrias para monitoramento *on-line* de substratos e produtos. Além disso, as indústrias que os utilizam, em geral, combinam estes instrumentos a sistemas de análise por injeção de fluxo (FIA) para monitoramento de componentes, controle da qualidade dos produtos e otimização do processo de manufatura (KENNA, 1999). Portanto, atualmente, o interesse no desenvolvimento de biossensores para este setor está relacionado à carência de instrumentos analisadores contínuos em linha e de baixo custo (CAMPANELLA *et al.*, 2008).

Nas indústrias de alimentos e bebidas, os biossensores também encontram um campo potencial de aplicação especialmente como detectores analíticos de carboidratos (glicose, sacarose, frutose, lactose e galactose), amido, álcool (etanol e metanol), uréia, aminoácidos, composição de vitaminas e análise de corantes, estabilizantes e emulsificantes (MELLO & KUBOTA, 2002). A atual detecção da maioria destes compostos é realizada industrialmente utilizando métodos cromatográficos, por medida da atividade ótica, por medida do índice de refração ou por métodos analíticos padrões

através de reações químicas, que requerem pré-tratamento da amostra e são muito sensíveis à presença de compostos interferentes.

Na área ambiental, a aplicação dos biossensores é interessante, visto que eles apresentam características importantes quando se deseja fazer uma monitoração ambiental, como: portabilidade, custo baixo (tanto por sistema, como por análise), preparação mínima de amostra e estabilidade do instrumento frente aos inúmeros obstáculos existentes neste campo (amplo número de potenciais poluentes, suas várias classes químicas e altas concentrações). Os biossensores são usados na monitoração e controle do ambiente, principalmente na detecção de metais pesados em amostras de solo e herbicidas e pesticidas em amostras de água de rios e lagoas (VELASCO-GARCIA & MOTTRAM, 2003). Mais recentemente, os biossensores tem tido uma utilização crescente com o desenvolvimento de dispositivos analíticos com capacidade de resposta em tempo real, na detecção e monitoração de agentes químicos e biológicos perigosos.

Portanto, devido a esta grande necessidade de monitoração ambiental, o atual trabalho visa desenvolver um biossensor amperométrico prático e portátil para a detecção de fenol em amostras líquidas, usando tecido de *Agaricus bisporus* como biocomponente. A escolha do analito se baseou no fato de ser um poluente de grande toxicidade e presente em diversos tipos de efluentes industriais, inclusive das empresas petrolíferas.

A falta de credibilidade dos biossensores para a aplicação em algumas áreas é ainda um grande problema que contribui para a escassez dos biossensores no mercado. Uma das soluções para este problema tem sido o desenvolvimento de sensores

multienzimáticos que permitam a determinação simultânea de compostos de interesse presentes em uma mesma amostra, diminuindo custos, visto que é necessário o uso de um único instrumento e ainda possibilitam, em alguns casos, que possíveis compostos interferentes sejam eliminados. No entanto, independente da área de atuação, a maioria dos biossensores já utilizada é do grupo dos enzimáticos eletroquímicos.

3.4.5. Mercado dos Biossensores

A área de diagnóstico, como um todo, representa um mercado imenso, bem implementado e em contínua expansão (Figura 9). Neste mercado, encontra-se uma das maiores razões de sucesso e a maior área de aplicação dos biossensores.

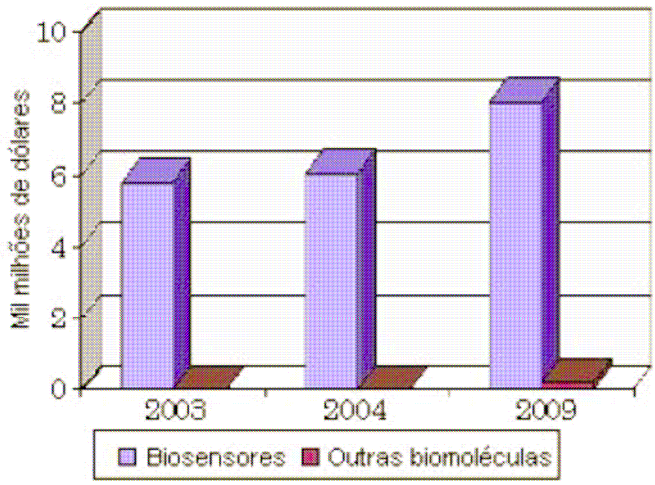

Figura 9: Valores projetados para o mercado de biossensores e bioeletrônicos até 2009 (BUSINESS COMMUNICATIONS COMPANY *apud* PATACAS, 2007).

Prevê-se que o mercado global de biossensores e outros produtos bioeletrônicos cresça dos 6,1 milhões de dólares em 2004 para 8,2 milhões de dólares em 2009, tendo um crescimento anual médio da ordem dos 6,3%. Os biossensores de glicose constituíram a quase totalidade das vendas em 2003; no entanto, as vendas de outros materiais bioeletrônicos estão em ascensão (PATACAS, 2007). Portanto, as aplicações às ciências biomédicas e da vida dominam o mercado, com 99%, deixando a monitoração ambiental num distante segundo lugar (Figura 10).

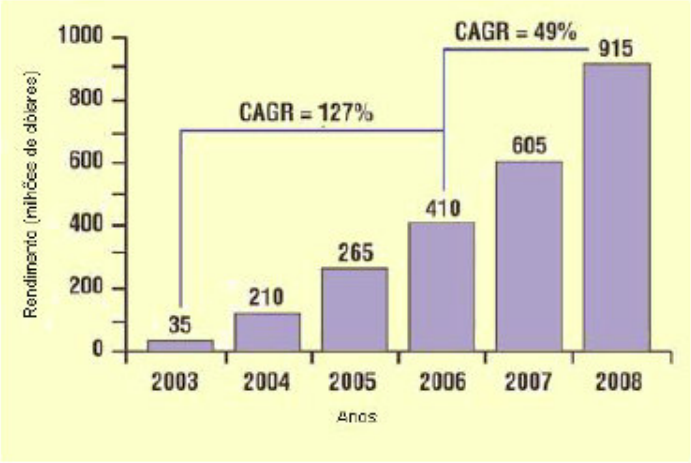

Figura 10: Expansão esperada para o mercado para nano biossensores que se prevê que venha a ser de um crescimento composto anual (cagr) de 92% até 2008 apenas com as aplicações devidas à aplicação da nanotecnologia ao diagnóstico médico (FRONT LINE STRATEGIC CONSULTING INC., San Mateo, CA, 2003 *apud* PATACAS, 2007).

Em relação ao mercado brasileiro, o Professor Doutor Lauro Kubota (Unicamp) critica: "Existe forte resistência porque grandes laboratórios e empresas fabricantes não vão querer substituir seus equipamentos sofisticados por dispositivos tão simples e baratos. Os lucros dependem da tecnologia que dispõem e que inclusive justifica os preços cobrados pelos exames. Os pacientes, por sua vez, preferem acreditar na análise

feita em aparelhos cheios de luzes e botões, mesmo que o biossensor apresente resultados até melhores" (http://www.clubedeengenharia.org.br/).

Como prospecção futura de aplicação dos biossensores, o crescente desenvolvimento de biossensores miniaturizados vem ampliar e muito o campo de aplicação e uso destes instrumentos e, futuramente, acredita-se que com os "novos elementos" e com o aperfeiçoamento dos biossensores existentes, a falta de credibilidade, que atualmente ainda existe, para o uso destes instrumentos para aplicações industriais, deixe de ser um grande problema.

CAPÍTULO 4: MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Equipamentos

Durante o presente trabalho, foram utilizados os seguintes equipamentos: estufa de secagem (Quimis); placa de aquecimento e agitação (Quimis); agitador orbital (Tecnal TE-420); espectrofotômetro (Hach DR/4000UV); bomba a vácuo (Motores Elétricos Brasil S.A); medidor de pH (Chemcadet); centrífuga (Excelsa 2); bomba de aquário (Aqualife 200); eletrodo de oxigênio dissolvido série InPro 6800 de 12mm (Mettler Toledo) conectado ao medidor e transmissor de oxigênio dissolvido modelo O_2 4050e (Mettler Toledo).

4.2. Material de estudo: tecido fúngico

Os corpos de frutificação do fungo *Agaricus bisporus*, conhecido vulgarmente como cogumelo champignon de Paris, utilizados ao longo deste trabalho, foram adquiridos em dois mercados populares situados na cidade do Rio de Janeiro (RJ): CADEG (Benfica) e COBAL (Humaitá). Eles foram comprados sempre em um mesmo revendedor, evitando, assim, maiores variações entre os mesmos. Todos os lotes adquiridos apresentaram aparência similar (coloração branca, poucas vezes com um tom amarronzado). Os cogumelos foram utilizados após, no máximo, 3 dias de sua compra. Até a sua utilização, foram conservados sob refrigeração a 4°C.

Vale ressaltar que o objetivo inicial era utilizar os resíduos do cultivo de *Agaricus bisporus*, porém não foi possível obtê-los de algum fornecedor próximo à cidade do Rio de Janeiro.

4.3. Métodos Analíticos

4.3.1. Procedimento de extração da tirosinase

A fim de extrair a enzima tirosinase do material de estudo utilizado, foi seguido o procedimento de extração enzimática desenvolvido por KAMEDA (2003). Os corpos de frutificação de *Agaricus bisporus* (340g) foram triturados em acetona gelada (1250mL) e o preparado foi filtrado em papel filtro (Whatman nº1) à vácuo. Em seguida, a pasta resultante foi congelada por 24 horas a 0°C. Posteriormente, esta foi ressuspensa em água destilada (150mL) e resfriada por 24 horas a 4°C. Finalmente, a pasta foi centrifugada a 3000rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante obtido, o primeiro extrato enzimático. As etapas de ressuspensão e centrifugação foram realizadas por mais uma vez, gerando o segundo extrato enzimático.

4.3.2. Procedimento de dosagem da atividade enzimática dos extratos

A atividade tirosinásica dos extratos enzimáticos foi medida segundo CAMPOS *et al.* (1996). O procedimento consistia em adicionar em um bécher 5,5mL de solução 0,2M de tampão fosfato de sódio a pH 6,0, 1,5mL de solução 0,2M de L-tirosina, e 1mL do extrato enzimático previamente diluído em uma razão de 1:10 no mesmo tampão. A

mistura foi levada para análise em espectrofotômetro, onde a variação de absorvância proveniente da reação enzimática foi lida em λ=280nm em intervalos de 30 segundos durante 999 segundos.

A unidade de atividade enzimática da tirosinase foi definida como sendo a quantidade de enzima que promove o incremento de 0,001 na absorvância a 280nm por minuto. A atividade foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$A = \frac{(Abs_2 - Abs_1) \times 1000 \times D_E}{(t_2 - t_1) \times V_E} \text{ (U/mL)}$$

Onde: Abs_1 e Abs_2 são absorvâncias nos tempos t_1 e t_2 em sua fase de aumento linear; V_E é o volume da solução enzimática (1mL) e D_E é a diluição da solução enzimática.

4.3.3. Procedimento de dosagem do fenol

A concentração do fenol não reagido presente nas amostras foi determinada pelo método colorimétrico direto descrito no *Standard Methods* (APHA, 1992), empregando o regente 4-aminoantipirina como agente complexante. Este método permite a dosagem de fenol simples e fenóis substituídos, exceto na posição *para*. As amostras de 7mL foram filtradas em cartuchos C18 PR – COLA, a fim de retirar qualquer interferente e resíduo de tecido fúngico e, quando necessário, diluídas a uma proporção de 1:2.

A quantificação do fenol foi realizada pela adição de 250µL de hidróxido de amônio 0,5M a 10mL da amostra diluída ou de água destilada (branco da reação). Posteriormente, adicionaram-se 100µL da solução de 4-aminoantipirina a 2% (p/v) e 100µL da solução de ferricianeto de potássio a 8% (p/v). O pH foi ajustado para 7,9 (± 0,1) pela adição de hidróxido de amônio 0,5M ou solução tampão de potássio pH 6,8. Após 15 minutos, a absorvância da amostra foi lida em espectrofotômetro em λ=500nm.

A fim de construir a curva padrão do método utilizado, as soluções de fenol, com concentrações de 1 a 5ppm, foram preparadas a partir de diluições, com água destilada, de uma solução estoque de 1000ppm de fenol. O branco da reação consistiu de água destilada.

4.3.4. Testes de remoção do fenol usando o tecido fúngico

Para as reações enzimáticas de remoção do fenol, foram utilizados erlenmeyers de 500mL com volume reacional de 250mL, com concentração inicial de fenol de 10ppm (água destilada e fenol). À solução aquosa de fenol foram adicionados 5g de tecido fúngico de tamanho previamente selecionado. O sistema foi colocado em shaker sob agitação de 200rpm e temperatura controlada a 30°C.

Para a dosagem do fenol não reagido durante o experimento, amostras de 7mL foram retiradas no tempo inicial (0 minuto) e em intervalos de 30 minutos até completar um total de 180 minutos de reação. Em cada amostra coletada, a reação foi interrompida pela inativação da enzima usando aquecimento por 5 minutos em "banho maria" a 100°C.

Em todos os testes posteriores de remoção de fenol, onde foi aplicado o tecido fúngico, foram utilizados cogumelos de um mesmo lote visando eliminar variações que poderiam ocorrer em função da utilização de diferentes lotes.

4.3.4.1. Testes de estudo da influência do envelhecimento do tecido fúngico na remoção de fenol

A fim de verificar a influência do envelhecimento dos corpos de frutificação do macrofungo de estudo, *A. bisporus*, no percentual de remoção de fenol em amostras padrão, os pedaços de tecido fúngico de tamanho 1,0cm^3, com tempos diferentes de estocagem em geladeira até realização dos ensaios (3 e 18 dias), foram colocados em contato com a solução de fenol de 10ppm. Os ensaios, que tiveram duração de 180 minutos, foram conduzidos segundo o item 4.3.4.

4.3.4.2. Testes de remoção de fenol variando o tamanho do tecido fúngico utilizado

Para os testes de remoção do fenol variando o tamanho do tecido fúngico, realizados em triplicata, as reações enzimáticas foram conduzidas conforme descrito acima no item 4.3.4. Os corpos de frutificação foram cortados em forma de cubo, em três tamanhos distintos: pequeno de 0,5cm^3 (DEC & BOLLAG, 1994), médio de 1,0cm^3 e grande de 1,5cm^3.

Os cogumelos foram cortados manualmente utilizando bisturi previamente esterilizado em estufa. Além disso, o uso de luvas descartáveis garantiu que o tecido fúngico se mantivesse livre de outras substâncias que poderiam estar presentes na pele.

4.3.4.3. Testes de estudo do efeito da temperatura na remoção do fenol

Inicialmente, o comportamento da enzima tirosinase aprisionada no tecido fúngico foi verificado dosando-se a concentração de fenol não removido no meio reacional, durante 180 minutos, nas seguintes temperaturas controladas: 23,5°C; 28°C; 30ºC e 35ºC. Posteriormente, resolveu-se estudar o comportamento dessa enzima em temperaturas mais altas como: 40ºC, 45ºC, 50ºC, 55ºC e 60ºC. Ademais, os testes foram realizados seguindo as condições descritas no item 4.3.4, porém com o tamanho fúngico já definido em cubos de 1,0cm^3. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.3.4.4. Testes de estudo sobre o efeito do pH da solução na remoção do fenol

O efeito do pH da solução na remoção do fenol pela tirosinase presente no tecido fúngico foi analisado através da quantificação deste composto não reagido. Para os testes, realizados em triplicata, a água destilada, utilizada na diluição da solução estoque, foi substituída por tampão fosfato de sódio em diferentes valores de pH de interesse: 6,0; 7,0 e 8,0. O valor de pH foi medido diretamente no eletrodo de pH, previamente calibrado com os tampões-padrão 4,0 e 7,0, sendo os demais parâmetros

reacionais, como descrito no item 4.3.4, e a temperatura fixada em 40ºC e o tamanho do tecido fúngico em $1cm^3$.

4.3.5. Verificação e quantificação da presença do fenol no tecido fúngico

Os testes preliminares, que visaram verificar a presença de fenol no tecido íntegro nos tamanhos $0,5cm^3$ e $1,0cm^3$, foram conduzidos através da quantificação de fenol no meio reacional, no tempo 0 minuto, quando o procedimento de homogeneização foi realizado ou não. Os pedaços do biocomponente foram colocados em contato com a solução de fenol a 10ppm e, em seguida, retirou-se uma alíquota de 7mL para dosagem de fenol segundo descrito em 4.3.3. Paralelamente, fez-se a quantificação apenas da solução de 10ppm de fenol.

De posse dos resultados dos primeiros testes, visou-se quantificar a concentração do analito de estudo no biocomponente de tamanho $1,0cm^3$. Para isso, as reações foram realizadas em erlenmeyer com volume reacional de 250mL de água destilada com a presença de 5g de tecido fúngico. O sistema foi agitado com 200rpm em shaker e temperatura controlada de 30°C. Nos testes que duraram 180 minutos, a cada 30 minutos, foram tiradas alíquotas de 7mL, além do ponto inicial (0 minuto), para quantificação de fenol seguindo método de dosagem descrito no item 4.3.3.

4.3.6. Testes de estudo de adsorção de fenol no tecido fúngico

Para verificar se a remoção de fenol durante os testes supracitados era devido apenas às reações enzimáticas, isto é, atuação da enzima tirosinase presente no tecido fúngico, e não pela possível adsorção do mesmo no cogumelo, foram realizados testes comparativos. Em um erlenmeyer de capacidade de 500mL foi adicionado o tecido fúngico previamente fervido por 5 minutos em "banho maria" a 100°C e em outro se usou o tecido sem qualquer tratamento térmico.

Os testes foram conduzidos em triplicata e utilizando-se as seguintes condições: agitação de 200rpm; temperatura controlada de 30°C; volume reacional de 250mL com solução de fenol com concentração inicial de 10ppm e tecido fúngico nos tamanhos de $0,5cm^3$ e $1,0cm^3$.

4.3.7. Testes usando tecido fúngico como biocomponente e o eletrodo de oxigênio como transdutor

Após os testes de estudo da enzima tirosinase presente no tecido fúngico dos corpos de frutificação de *Agaricus bisporus*, foram desenvolvidos os ensaios para a confecção do biossensor, onde se utilizou o eletrodo de oxigênio como transdutor (Anexo 1).

As medidas amperométricas foram realizadas em um bécher de vidro (capacidade de 50mL) sob temperatura ambiente (24°C ± 1°C), empregando um eletrodo de oxigênio tipo Clark. Esse eletrodo contendo um catodo de platina e um

anodo de Ag/AgCl foi polarizado em um potencial constante de –675mV por, no mínimo 6 horas, antes de cada calibração. Este foi calibrado seguindo procedimento de calibração de um ponto simples, onde para o ponto de 100% de oxigênio foi utilizada água destilada saturada por ar. O procedimento foi repetido sempre que o eletrodo seco, quando exposto ao ar, não apresentou leitura próxima a 100%.

Finalmente, vale dizer que, a fim de minimizar as trocas de gases entre o meio externo e a solução de análise, o bécher sempre foi vedado com papel filme.

É importante relatar que, paralelamente, a esses testes foram feitos ensaios visando avaliar a variação de oxigênio dissolvido devido apenas à inserção do transdutor na solução de fenol (em diversas concentrações). Os ensaios se sucederam como supracitado, apresentando como variação apenas a ausência do biocomponente.

4.3.7.1. Estudo das melhores condições relativas à quantidade de massa de tecido fúngico e tempo de reação para a construção do biossensor

Os primeiros testes utilizando o eletrodo de oxigênio como transdutor, visaram escolher a melhor quantidade de tecido fúngico e o tempo de reação enzimática que promoveriam resposta, na variação da concentração de oxigênio dissolvido, com menor desvio padrão.

Os testes foram realizados em um bécher de vidro (capacidade de 50mL) sob temperatura ambiente (24°C ± 1°C), com a presença de volume reacional de 50mL de solução fixa de fenol de 10ppm. Utilizou-se tampão fosfato de sódio pH 8,0 para

diluição das amostras e tecido fúngico cortado em forma de cubos de $1cm^3$. As leituras, em 5 réplicas, foram realizadas após 1 minuto de estabilização do eletrodo na solução. A fim de escolher a quantidade do biocomponente foram escolhidas as quantidades: 1g, 3g e 5g. Além disso, para a escolha do melhor tempo reacional foram, inicialmente, escolhidos os tempos de 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos. Posteriormente, escolheram-se tempos menores: 1, 3 e 5 minutos. A cada teste, o eletrodo de oxigênio foi lavado com água destilada e seco com papel macio.

4.3.7.2. Testes visando obter a calibração sistema: tecido fúngico e eletrodo de oxigênio

A fim de realizar a calibração do sistema contendo o tecido fúngico e eletrodo de oxigênio, foram realizados testes, com 5 réplicas, variando a concentração do analito, solução de fenol, em uma faixa de concentração de 0 a 10ppm e analisando a progressão das leituras de variação de oxigênio dissolvido.

4.3.7.2.1. Estudos de repetibilidade do sistema biossensor, utilizando o eletrodo de oxigênio e o tecido fúngico e de análise da influência e necessidade de lavagem do transdutor a cada leitura

Para estudar a viabilidade da reutilização dos pedaços ($1,0cm^3$) de tecido fúngico em sucessivas análises e a influência e a necessidade da lavagem do eletrodo de

oxigênio entre cada leitura, ensaios foram conduzidos inserindo o transdutor em 50mL de uma solução de fenol, com concentrações variando de 0 a 5ppm, diluídas em tampão fosfato de sódio pH 8,0, em um bécher de vidro a temperatura ambiente (24°C ± 1°C) contendo 5g de tecido fúngico cortado em forma de cubos de $1cm^3$. A faixa de variação de concentração do analito foi escolhida, baseando na faixa de resposta linear do teste colorimétrico direto do *Standard Methods* (APHA, 1992), 0 a 5ppm. As análises foram realizadas a cada 1 minuto de reação transcorrido e, ao final de cada leitura, o transdutor foi ou não lavado com água destilada e seco com papel macio.

4.3.7.2.2. Testes de estudo da influência da saturação inicial das soluções em relação ao oxigênio dissolvido, nas leituras do eletrodo de oxigênio

Testes foram realizados com o intuito de avaliar a influência da saturação inicial das soluções em relação à quantidade de oxigênio dissolvido Para isto foi realizado borbulhamento de ar das mesmas antes de cada teste. O objetivo desse procedimento era fazer com que todas as soluções começassem com a mesma concentração inicial de oxigênio, evitando assim, mais interferentes na resposta final em relação a variação de oxigênio dissolvido obtida resultante da reação enzimática.

Os testes foram conduzidos como descrito no item 4.3.7.2.1., no entanto, acrescentou-se o processo de aeração prévia das soluções de fenol onde foi realizado o borbulhamento de ar por 5 minutos (SILVA, 2008), empregando-se uma bomba de aquário. Devido aos resultados encontrados, além disso, foram realizados ensaios com 3g e 5g de tecido fúngico de $1,0cm^3$ nos tempos reacionais de 5 e 3 minutos, respectivamente.

Cabe ressaltar que paralelamente a isso, foram realizados testes visando estudar a influência deste procedimento quando se tinha apenas o sistema transdutor e solução com o analito, sem a presença do biocomponente.

4.3.7.2.3. Estudos de estabilidade do sistema biossensor: eletrodo de oxigênio e o tecido fúngico

A fim de estudar a estabilidade do sistema montado, foram feitos experimentos diários com os mesmos pedaços de 1,0cm^3 do tecido fúngico na quantidade de 5g. De um dia para o outro, o biocomponente foi guardado em geladeira. Os testes foram conduzidos em um bécher a temperatura ambiente (24°C ± 1°C) com solução de fenol (50mL) variando entre 3 e 10ppm. O eletrodo foi imerso na solução e após a estabilização, o valor inicial da concentração de oxigênio dissolvido registrado pelo eletrodo foi anotado e, decorrido o tempo de reação de 1 minuto, o valor da concentração de oxigênio dissolvido também foi registrado. A diferença entre estes valores indicaram a variação da concentração de oxigênio dissolvido para a concentração de fenol em estudo sob as condições citadas.

Além disso, foram realizados ensaios para avaliar a variação da concentração de oxigênio dissolvido devido apenas à inserção do transdutor na solução de fenol (em diversas concentrações), sendo um "teste em branco" para avaliar possíveis interferências nas medidas Os ensaios foram conduzidos do mesmo modo como descrito anteriormente, no entanto, não foi utilizado o biocomponente (macrofungo).

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração e determinação da atividade enzimática da tirosinase

A extração da enzima tirosinase seguiu o protocolo desenvolvido por KAMEDA (2003). Além do sobrenadante inicial, primeiro extrato enzimático, foi realizada uma segunda etapa de extração da enzima ainda contida na pasta obtida. Os resultados das atividades enzimáticas em $U.mL^{-1}$ dos primeiros oito lotes de cogumelos são apresentados na Figura 11. Cabe ressaltar que, durante o presente trabalho, foram usados mais de oito lotes, porém como seguiram o mesmo padrão de comportamento, segundo extrato com mais atividade que o primeiro, os resultados não são mostrados na Figura 11. Os valores de atividade enzimática de todos os lotes utilizados no trabalho variaram de $20,2U.mL^{-1}$ a $2400U.mL^{-1}$.

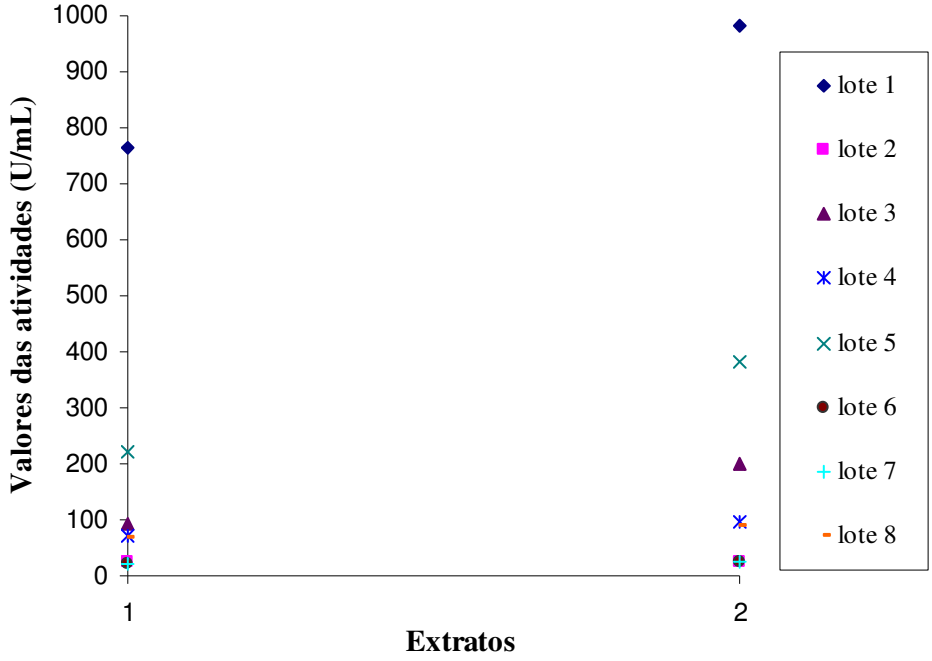

Figura 11: Comparação da atividade da tirosinase nos extratos obtidos pelo processo de extração enzimática, descrito no item 4.3.1, da massa de cogumelos dos primeiros oito lotes usados no trabalho.

Analisando os dados obtidos (Figura 11), pode-se observar que, após a primeira extração enzimática, ainda permaneceu uma quantidade significativa da enzima na pasta de cogumelos resultante. Isso pode ser confirmado visto que houve um aumento significativo na atividade enzimática do segundo extrato enzimático se comparado com o primeiro, variando de 11,11% a 150%. Os resultados são corroborados com os resultados de PAPA *et al.* (1994) e KAMEDA (2003), onde foram encontrados, pelo último, valores de incremento com a re-extração na faixa de 19,16% a 139,51%.

A tirosinase proveniente de tecido fúngico, como no caso de *Agaricus bisporus* (objeto de estudo), encontra-se no citoplasma (MAYER & HAREL, 1991 *apud* VAN GELDER *et al*., 1997). Portanto, a presença de maior atividade no segundo extrato enzimático em relação ao primeiro pode ser devido ao maior rompimento celular durante o processo de re-extração, facilitando a difusão da enzima do interior celular para o meio aquoso (extrato).

Além disso, embora os lotes de cogumelos empregados fossem visualmente parecidos, pelos dados, pode-se constatar uma enorme diferença entre suas atividades enzimáticas. INGEBRIGTSEN *et al.* (1989) relataram que um fator que influencia a atividade da tirosinase no extrato é o grau de maturação dos cogumelos. Portanto, provavelmente, apesar da aparência similar, os cogumelos estavam em grau de maturação distinto.

Ainda sobre a tirosinase no tecido de *Agaricus bisporus*, a presença de suas isoformas já foi relatada na literatura (WHICHERS *et al.,* 1996; ESPÍN & WHICHERS, 1999). Aparentemente, cerca de 98-99% do total da enzima estão presentes na sua forma latente. Em relação a esse fato, o trabalho de BEVILAQUA (2000) mostrou que a variação presente nos extratos enzimáticos ocorreu quando se comparou cogumelos envelhecidos e o lote controle, onde se observou um aumento de 48% na atividade enzimática do primeiro em relação ao segundo. Dessa observação, BEVILAQUA (2000) concluiu que o envelhecimento do cogumelo deve ser responsável pela ativação de formas latentes da enzima.

5.2. Estudo do efeito do envelhecimento do cogumelo na remoção do fenol

A fim de constatar a influência do tempo de estocagem do lote em geladeira na atividade enzimática do mesmo, paralelamente aos ensaios principais, foi realizado um experimento com um lote, avaliando a remoção de fenol com 3 e 18 dias de compra do mesmo. O ensaio, realizado em triplicata, foi conduzido conforme procedimento descrito no item 4.3.4. A Figura 12 mostra os resultados, onde se observa remoção após 180 minutos de, aproximadamente, 58,5% e 70,6%, quando foram utilizados os cogumelos com 3 e 18 dias após a compra, respectivamente, mostrando um aumento significativo na remoção de fenol de 12,1%.

As etapas de extração e medida da atividade da enzima presente neste tecido fúngico, além do estudo da influência do envelhecimento dos corpos de frutificação na remoção de fenol, foram essenciais para o desenvolvimento dos demais ensaios que visaram à elaboração do biossensor. Visto que, a fim de garantir uma constância em relação ao componente biológico aplicado, a partir dos resultados obtidos, os testes subseqüentes foram sempre realizados com o mesmo lote de cogumelo, no máximo com até 3 dias de compra.

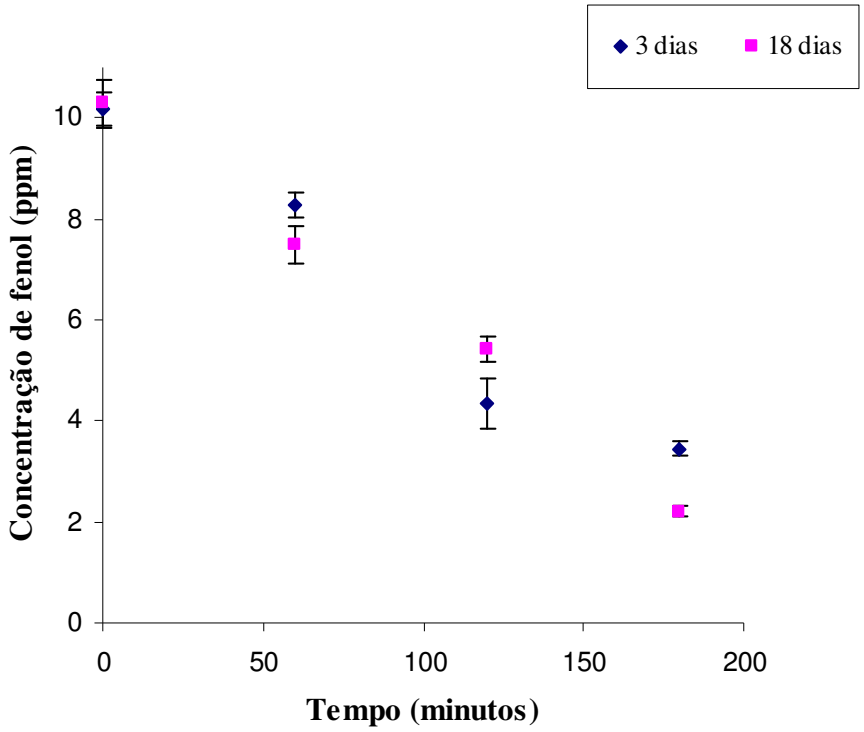

Figura 12: Perfil da concentração de fenol, ao longo de 180 minutos, utilizando tecido fúngico de tamanho de 1,0cm^3 com 3 e 18 dias de compra do lote.

5.3. Seleção do melhor tamanho do tecido fúngico para a reação de remoção do fenol

Para os testes de seleção do melhor tamanho de tecido fúngico para seu futuro uso como biocomponente no biossensor amperométrico de fenol, foram testados três tamanhos diferentes (0,5; 1,0 e 1,5 cm^3). A observação da pouca variação colorimétrica da solução de fenol ao longo dos 180 minutos de experimento usando o método de dosagem do fenol do *Standard Methods* (APHA, 1992) e, os resultados numéricos de percentagem de remoção de fenol, não passando de uma média de 30,42%, mostraram que o maior tamanho não era a melhor escolha. A Figura 13 mostra a variação da

concentração de fenol ao longo do tempo de experimento utilizando os três tamanhos de estudo.

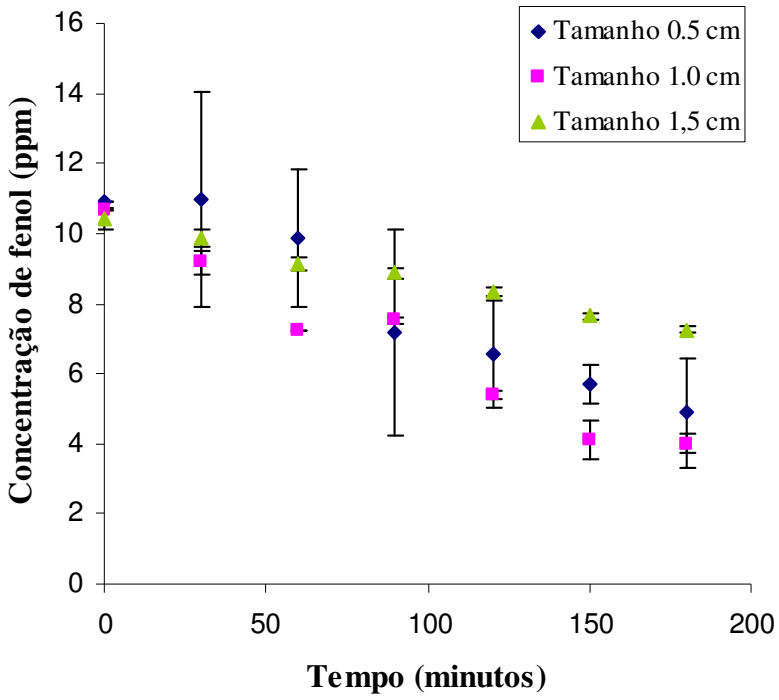

Figura 13: Remoção de fenol com tecido fúngico nos três tamanhos estudados (0,5 cm^3; 1,0cm^3 e 1,5cm^3).

Os resultados dos testes apresentados na Figura 13 mostram que, ao longo de 180 minutos de reação, houve a remoção de 62,5% e 55,15% do fenol da solução inicial, utilizando os tamanhos 1,0cm^3 e 0,5cm^3 do tecido fúngico, respectivamente. Comparando a percentagem de remoção do fenol e analisando o desvio padrão das respostas encontradas, pôde-se perceber que este foi bem menor para o tecido fúngico de 1,0cm^3, garantindo que os resultados com este tamanho são mais reprodutíveis. Logo, o melhor tamanho de tecido fúngico escolhido foi de 1,0cm^3.

DEC & BOLLAG (1994) usaram tecido vegetal, como fonte de peroxidases, no tratamento de efluentes com compostos fenólicos. Usando tecido de raiz-forte cortado em cubos de 0,5cm^3 obtiveram remoção de 100% do poluente em questão. KAMEDA (2003) utilizou a tirosinase no tecido fúngico de *Agaricus bisporus* em pedaços cúbicos de 0,5cm^3 e de forma extraída (procedimento desenvolvido durante o seu trabalho) no estudo de remoção de fenol em efluente sintético. Em experimentos comparando a remoção usando ambas as formas da enzima, após 9 horas, não houve diferença significativa na remoção (~ 90%) do poluente, mostrando que a etapa de extração enzimática não era necessária. Além disso, SILVA (2008) utilizou tecido de *A. bisporus* moído e em forma de cubos de 0,5cm^3 e 1,0cm^3 para remoção de cor de efluente sintético. Nas primeiras horas de experimento, não foi observada variação significativa no percentual de remoção com a utilização das três formas do biocomponente.

Portanto, ao contrário do que se esperava, o aumento da relação entre área superficial de contato e volume não promoveu aumento significativo na remoção de fenol no presente trabalho e demais da literatura. No entanto, o presente trabalho encontrou o tamanho de 1,0cm^3 como o melhor na remoção ao contrário de trabalhos supracitados que escolheram o corte do tecido em cubos de 0,5cm^3.

Cabe ressaltar que a comparação com trabalhos da literatura é difícil, visto que o tecido fúngico de *Agaricus bisporus* não é utilizado na sua forma íntegra no desenvolvimento de biossensores, sendo usado apenas como fonte para extração da

enzima tirosinase ou na sua forma triturada e misturada a demais compostos para sua imobilização.

5.4. Estudos visando à constatação da presença de fenol no tecido fúngico e sua quantificação

Como pode ser visto nas Figuras 12 e 13 dos itens 5.2 e 5.3, ambas as curvas, no tempo 0 hora, apresentam mais de 10ppm de fenol, valor da concentração inicial do experimento. Por este motivo, testes foram realizados a fim de constatar e quantificar a presença de fenol no tecido fúngico íntegro antes de sua utilização. Os resultados dos primeiros testes (Figura 14) mostraram um aumento significativo na quantidade de fenol quando foi colocado o tecido fúngico nos tamanhos 0,5cm^3 e 1,0cm^3 e, a solução passou por um processo de homogeneização manual, antes do erlenmeyer ser colocado no agitador orbital (shaker).

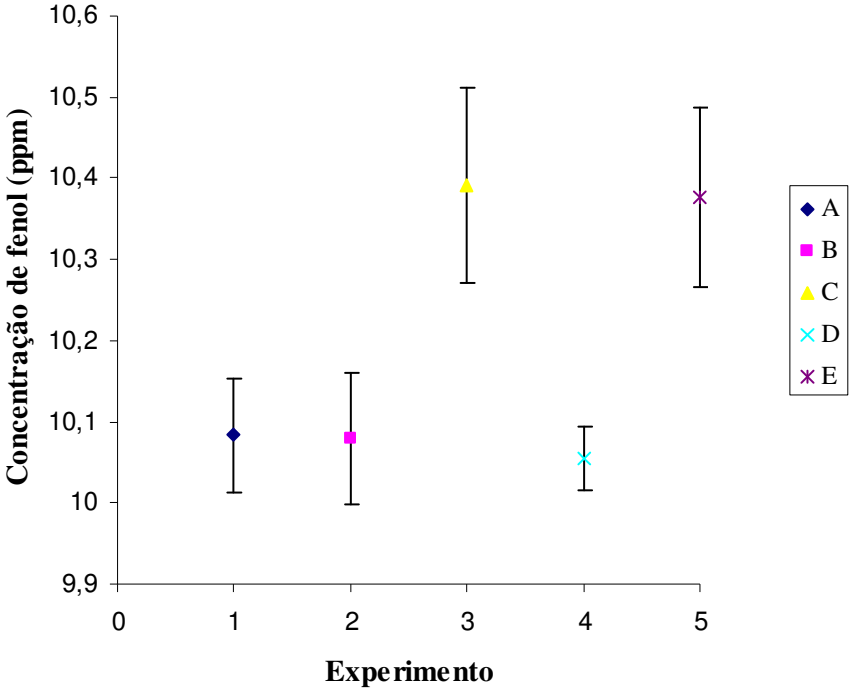

Figura 14: Ensaios relativos à presença de fenol no tecido fúngico íntegro. (A) apenas solução de fenol de 10ppm; (B) solução de fenol de 10ppm com tamanho pequeno sem homogeneização no ponto inicial; (C) solução de fenol de 10ppm com tamanho pequeno com homogeneização no ponto inicial; (D) solução de fenol de 10ppm com tamanho médio sem homogeneização no ponto inicial; (E) solução de fenol de 10ppm com tamanho médio com homogeneização no ponto inicial.

Posteriormente, foram feitos testes visando quantificar a concentração de fenol no tecido íntegro de tamanho de 1,0cm^3, com homogeneização no ponto inicial, usando água destilada no meio, ao longo de 180 minutos. Como pode ser constatado na Figura 15, o biocomponente apresentou compostos fenólicos em sua composição em uma concentração média de 0,306ppm.

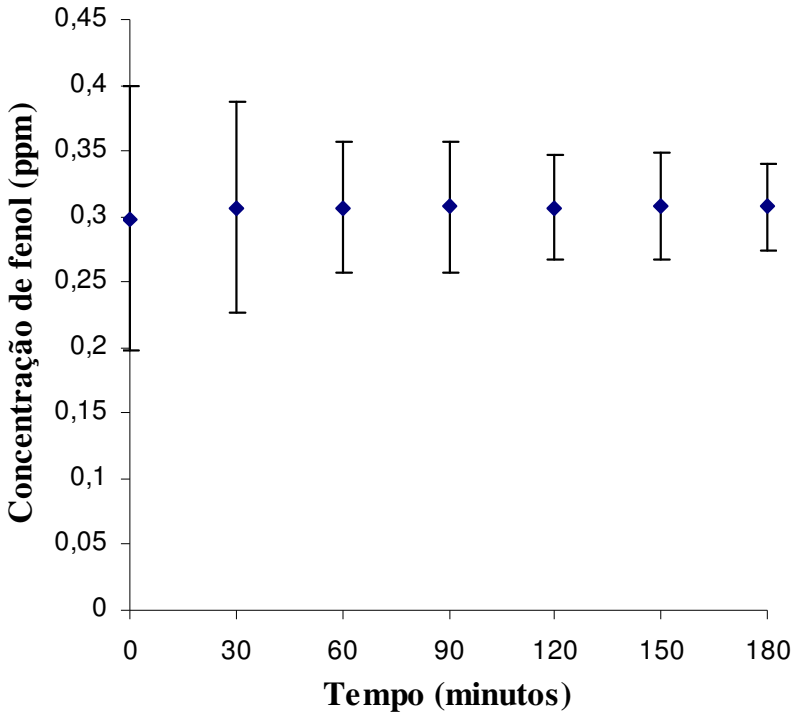

Figura 15: Testes visando quantificar a concentração de fenol no tecido íntegro de tamanho de 1,0cm^3, com homogeneização no ponto inicial, usando água destilada no meio, ao longo de 180 minutos.

O resultado positivo da presença de fenol no tecido fúngico, pode ser confirmado no trabalho de BARROS *et al*. (2008) que estudaram a composição de cinco espécies do gênero *Agaricus*, inclusive *A. bisporus*, encontrando compostos fenólicos na proporção de 4,49 ± 0,16mg/g nesta espécie.

5.5. Escolha da melhor temperatura de reação de remoção do fenol usando o tecido fúngico íntegro como fonte da enzima tirosinase

A escolha da melhor temperatura de reação de remoção do fenol foi realizada através do estudo do comportamento da tirosinase naturalmente presente no tecido de *A. bisporus* na faixa de temperatura que variou de 23,5°C a 60ºC, seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.3.4. Para isso, foi dosada a quantidade de fenol não removido nos respectivos meios reacionais para cada temperatura. As percentagens de eficiência de remoção do fenol estão mostradas na Figura 16. Os resultados demonstram que o aumento da temperatura promoveu o incremento na eficiência de remoção do fenol na faixa de temperatura de 23,5ºC a 40ºC, sendo o maior percentual de remoção observado na temperatura de 40ºC. A partir dessa, ocorre decréscimo da remoção de fenol, provavelmente pela perda de atividade enzimática da tirosinase causada pela temperatura elevada. Os percentuais de remoção, na faixa estudada de temperaturas, variaram de 31,14% até 75,13%.

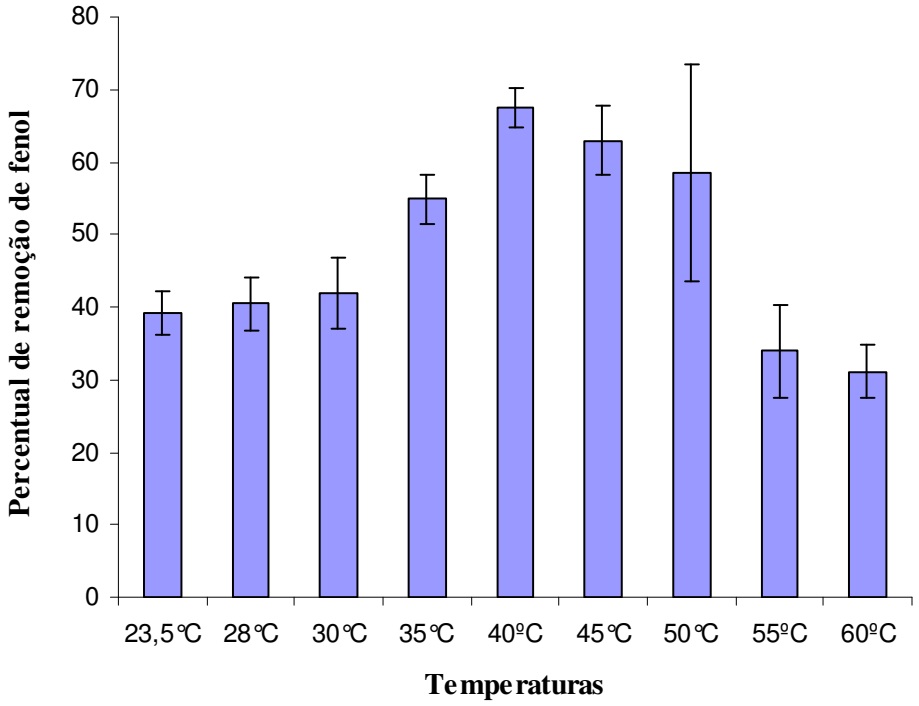

Figura 16: Comparação entre as eficiências de atuação da tirosinase nas diferentes temperaturas testadas.

Os maiores valores de remoção de fenol foram encontrados quando os testes foram conduzidos a 40ºC e, devido à maior diferença obtida entre as réplicas a 50°C (comprovado pelo desvio apresentado), foi considerada como uma faixa de melhor atuação da tirosinase presente no tecido fúngico íntegro entre 35°C e 45°C.

Na literatura, vários trabalhos indicam que o aumento da temperatura promove o aumento da atividade enzimática e que valores próximos a 40°C são os valores de temperatura ótimos para as enzimas polifenol oxidases estudadas, inclusive a tirosinase. Em relação ao material de estudo, mesmo que não na sua forma íntegra, alguns trabalhos

mostraram perfil da influência da temperatura semelhante ao encontrado nos resultados aqui descritos.

Segundo TOPÇU *et al*. (2004), a temperatura é um dos parâmetros mais importantes que afetam a performance de um biossensor. Portanto, durante o desenvolvimento de um biossensor utilizando tecido homogeneizado de *Agaricus bisporus* como biocomponente, estudou-se a influência da temperatura do instrumento, onde percebeu que o aumento deste parâmetro promoveu o aumento da sua atividade, tendo seu ponto ótimo em 40ºC (pH 8,0 e concentração de fenol de $80x10^{-3}$mM). No entanto, foi escolhida como temperatura de análise 35ºC, devido à estabilidade térmica do equipamento e sua vida útil.

MARÍN-ZAMOURA *et al*. (2006) relataram em seu trabalho que foi realizado um estudo da influência da temperatura na atividade de enzima fresca imobilizada de *A. bisporus* em uma faixa de 20ºC a 70ºC. O seu ponto ótimo foi encontrado em 55ºC.

SEZGINTURK *et al*. (2005) estudaram o efeito da temperatura no biossensor amperométrico para ácido benzóico em uma faixa de 20ºC a 45ºC, usando como biocomponente o macrofungo *Agaricus bisporus*. Sob as condições de pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 50mM), a temperatura ideal foi de 40ºC e, após esta, observou-se um decréscimo acentuado da atividade do biossensor. Porém, devido aos testes de estabilidade do aparato, a temperatura escolhida foi de 35ºC, visto que ao contrário do que ocorre quando se utilizou a temperatura ótima, não há perda de atividade nas primeiras três horas de experimento.

LEE *et al*. (1996) estudaram a influência da temperatura na atividade da β-tirosinase na remoção de fenol. A faixa ideal de trabalho encontrada foi de 55°C-60°C, sendo que sua atividade se manteve elevada ainda em 65°C.

CAMPANELLA *et al.* (1993), desenvolvendo um sensor enzimático (com a enzima tirosinase) para determinação de fenol, analisaram a influência da temperatura na atividade do instrumento. Quando usaram tanto tampão Tris quanto tampão fosfato, a sensibilidade aumentou até cerca de 40°C**.** No entanto, embora esta temperatura tenha parecido ser a melhor, acima de 25°C surgiram alguns problemas, como: aumento no tempo de estabilização da linha base e não foi possível evitar grande ruídos nos sinais detectados pelo instrumento. Além disso, a reprodutibilidade das medições diminuiu com o aumento da temperatura e, conseqüentemente, da taxa de desativação da enzima, encurtando a vida útil do sensor. Portanto, 25°C foi escolhida como a temperatura de atividade do sensor enzimático desenvolvido.

ASAV *et al*. (2008) investigaram o efeito da temperatura sobre a resposta do biossensor que se baseava na enzima tirosinase, utilizando a faixa de estudo de 15°C-40ºC. A partir dos resultados, puderam constatar que a melhor atividade do instrumento foi obtida a 30°C. Já a resposta do biossensor ótico de ABDULLAH *et al*. (2006), que usou tirosinase imobilizada em quitosana, frente a variação de temperatura de 25°C até 60°C mostrou que o aumento da temperatura promove o aumento da atividade enzimática, atingindo nível máximo em 45°C.

As diferenças nos valores ótimos de temperatura dos trabalhos descritos se devem as enzimas estudadas, assim como, aos demais parâmetros, como substrato, quantidade de enzima e seu estado (livre ou imobilizada), dentre outros.

Finalmente, vale ressaltar que apesar dos resultados encontrados, foi escolhida a temperatura ambiente (24°C ± 1°C) para a condução dos testes seguintes, visto que o objetivo é a construção de um instrumento simples para monitoração *in situ*. Portanto, adição de mais um aparato ao sistema biossensor não seria indicado e, além disso, como nesta temperatura há remoção de aproximadamente 40%, entendeu-se que este percentual seria suficiente para promover uma variação de oxigênio dissolvido no meio reacional que pudesse ser perceptível ao transdutor (eletrodo de oxigênio).

5.6. Escolha do melhor pH de reação de remoção do fenol usando a enzima tirosinase presente no tecido fúngico íntegro

Para a escolha do melhor pH de reação de remoção do fenol pela tirosinase presente no tecido fúngico, a água destilada foi substituída por tampão fosfato de sódio nos valores de pH de 6,0; 7,0 e 8,0 e, os testes foram realizados segundo o procedimento citado no item 4.3.4. Os resultados dos testes (Figura 17) demonstram que o melhor pH para a reação de remoção do fenol é o de valor 8,0. As curvas de remoção obtidas com o pH nos valores de 6,0 e 7,0 são pouco coerentes, provavelmente devido ao método colorimétrico de dosagem que foi escolhido (APHA, 1992). Nos experimentos realizados,

para se levar as soluções tampões de pH 6,0 e 7,0 ao valor exigido para dosagem do fenol das amostras, pH 7,9 (± 0,1), foi necessário adicionar uma grande quantidade de hidróxido de amônio. Fato que, possivelmente, ocasionou a diluição da amostra, levando a resultados discrepantes da realidade e pouco estáveis. Vale ressaltar que resultados semelhantes são encontrados em diversos trabalhos na literatura que estão descritos abaixo.

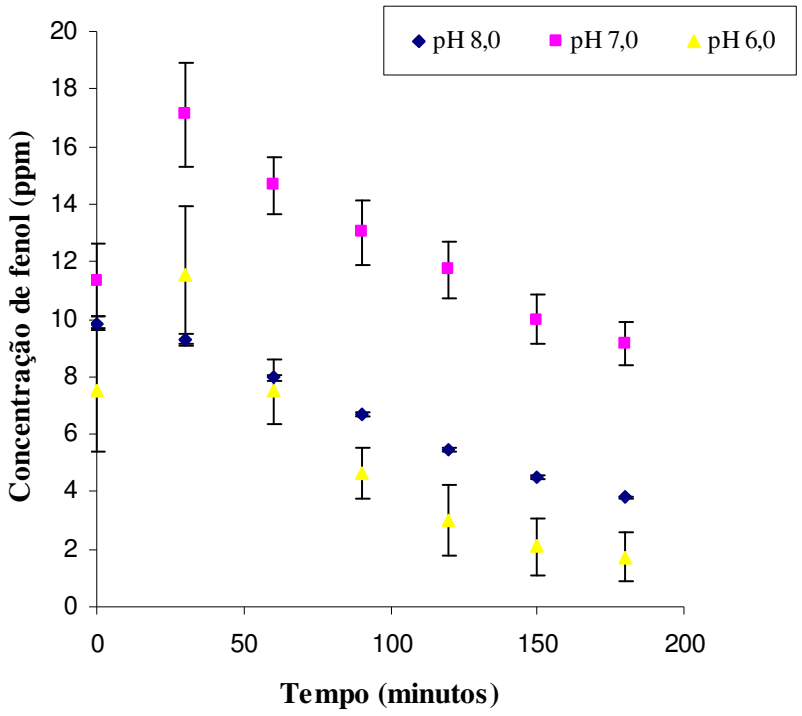

Figura 17: Comparação entre a remoção do fenol da solução padrão utilizando tampão fosfato com diferentes valores de pH.

TOPÇU *et al*. (2004) desenvolvendo um biossensor para compostos fenólicos usando tecido homogeneizado de *A. bisporus* (enzima tirosinase) e analisando alguns

efeitos inibidores, determinou o valor 8,0 como o pH ótimo (tampão fosfato de sódio 50mM) para atividade do biocomponente que faz parte do instrumento em temperatura de 35°C. No entanto, esta atividade permaneceu constante na faixa de pH de 6,5-9,5.

SEZGINTÜRK & DINÇKAYA (2008) desenvolveram um biossensor visando controlar tiouréia em sucos de fruta, para isso utilizaram tecido fúngico homogeneizado como biocomponente (fonte de polifenol oxidases). Na etapa de otimização, encontraram 7,5 como melhor valor de pH, utilizando tampão fosfato 50mM. Assim como no trabalho anterior, BEZERRA *et al*. (2003) acharam como pH ótimo para a máxima atividade da polifenol oxidase extraída de graviola o valor de 7,8, valor próximo ao encontrado, faixa de 7,0-7,5, quando se utilizou a enzima livre. Além disso, os resultados de LEE *et al.* (1996), quando estudaram o efeito do pH na atividade da enzima β-tirosinase na remoção de fenol, revelaram que a faixa ótima de pH era 7,5-8,0.

VIEIRA *et al*. (2004) usando extrato bruto de batata doce (presença de polifenol oxidase) na titulação amperométrica de compostos fenólicos, encontrou melhor resposta utilizando solução tampão fosfato 0,1M de pH 7,0. Ademais, SEZGINTURK *et al.* (2005) estudando a influência do pH na resposta do biossensor amperométrico para ácido benzóico usando tecido homogeneizado de cogumelo, encontrou melhor resposta usando solução tampão fosfato de sódio 50mM de pH 7,0 em temperatura controlada de 35°C.

Os resultados de CAMPANELLA *et al.* (1993), usando enzima tirosinase imobilizada, indicaram que o tampão Tris em pH 8,5 promove melhores condições e, em relação ao tampão fosfato, o melhor valor foi de pH 7,0. Na verdade, a tendência de

sensibilidade do instrumento *versus* pH em tampão fosfato mostrou um ligeiro platô para pH em torno de 7,0. Vale ressaltar que, além disso, o trabalho comenta que este valor de pH (7,0) geralmente é o considerado como o melhor para a atividade da enzima livre em solução. De qualquer modo, o trabalho afirma que a sensibilidade do sistema eletroquímico com a enzima imobilizada usando pH 7,0 é certamente menor do que em pH 8,5. No mesmo sentido, no trabalho de ASAV *et al*. (2008), os experimentos foram realizados com diferentes soluções tampão (acetato (pH 3,0 e 4,0); citrato (pH 5,0 e 6,0); fosfato (pH 7,0 e 8,0) e glicina (pH 9,0 e 10,0) para a determinação do efeito do pH sobre a resposta do biossensor. Os resultados obtidos mostraram que o valor do pH ótimo alcançado foi 7,0, não havendo resposta do biossensor nos valores 3,0 e 4,0.

Assim como foi dito em relação às variações entre os valores ótimos de temperatura, os valores ótimos de pH dos trabalhos descritos sofrem algumas modificações devido aos demais parâmetros utilizados nos ensaios, como temperatura, substrato, quantidade de enzima e seu estado (livre ou imobilizada), dentre outros.

5.7. Ensaios de estudo de adsorção no tecido fúngico durante o procedimento de remoção do fenol

A Figura 18 mostra o resultado obtido nos testes visando avaliar a possível remoção de fenol da solução de estudo pelo processo de adsorção no tecido fúngico de tamanho 1,0cm^3. É nítida a diferença entre o percentual de remoção de fenol usando o

tecido fúngico que passou pelo tratamento término (A) e o que não foi submetido a ele (B). No último, ocorreu remoção de 78,4%, enquanto no primeiro caso não houve remoção do analito de estudo. O mesmo resultado negativo para adsorção no tecido foi encontrado quando se utilizou o menor tamanho (0,5cm^3) (Figura 19).

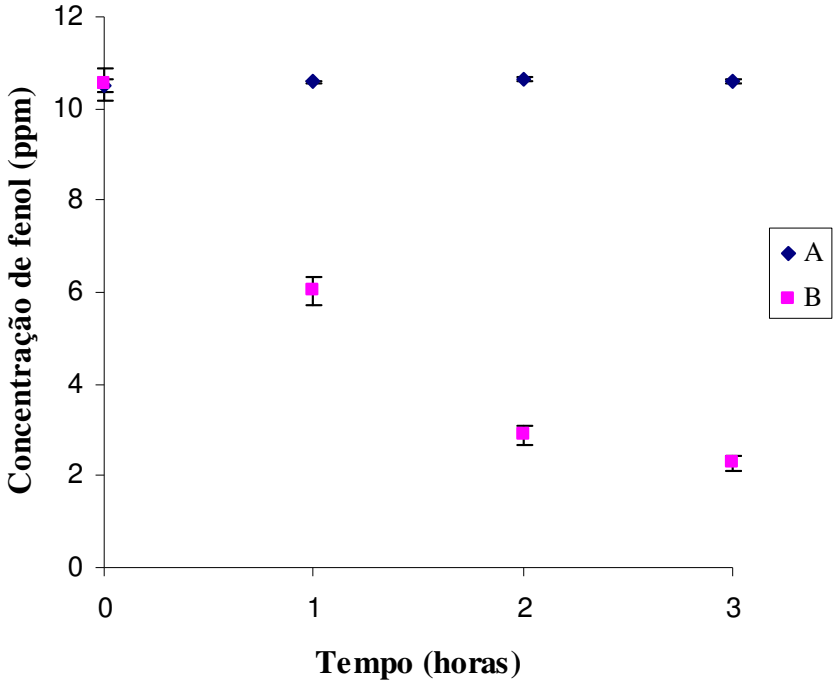

Figura 18: Resultados dos testes de estudo de adsorção de fenol no tecido fúngico de tamanho 1,0cm^3, onde (A) representa o procedimento utilizando tratamento térmico no tecido e (B) sem nenhum tratamento.

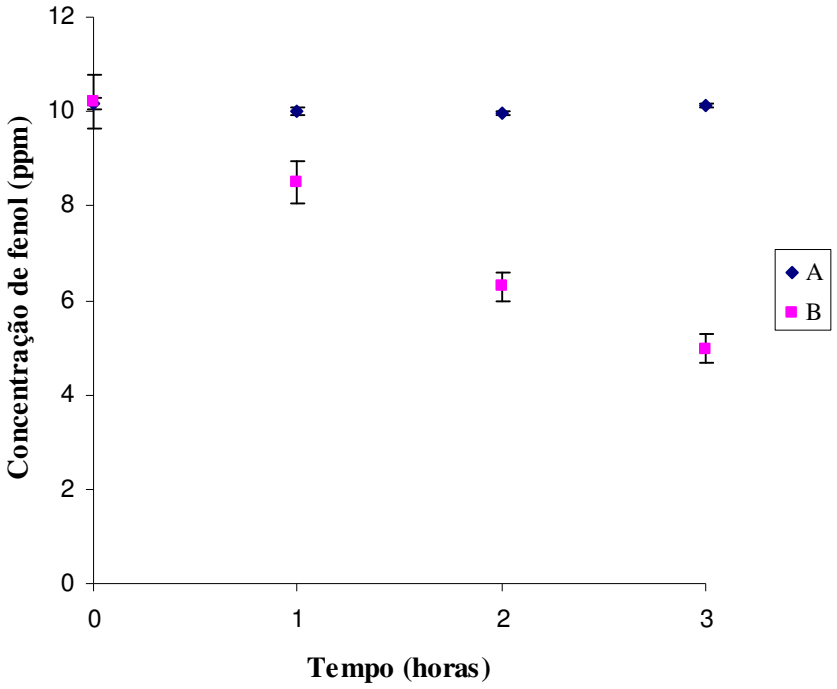

Figura 19: Resultados dos testes de estudo de adsorção de fenol no tecido fúngico de tamanho 0,5cm^3, onde (A) representa o procedimento utilizando tratamento térmico no tecido e (B) sem nenhum tratamento.

Assim como aconteceu neste trabalho, RODRIGUES *et al*. (2007) não verificaram concentração relevante de fenol adsorvido à biomassa fúngica quando investigaram a influência da glicose sobre o consumo de fenol no crescimento de *Aspergillus niger*. Concluíram, então, que o mecanismo de adsorção teve pouca influência na remoção global do fenol do meio sintético. As concentrações baixas de fenol adsorvido no micélio fúngico foram justificadas devido ao mecanismo de adsorção ser menos intenso em células vivas, sendo fortemente influenciado pelo pH e por fatores como propriedades da superfície do microorganismo, fisiologia da célula concentração do poluente e temperatura.

No entanto, os resultados encontrados nesse trabalho foram diferentes ao encontrado por SILVA (2008) quando utilizou cogumelos moídos de *Agaricus bisporus* na remoção de cor de efluente sintético. Os seus experimentos mostraram que a maior parcela de remoção de cor foi obtida por adsorção do corante à superfície do cogumelo e não pela ação enzimática da tirosinase. A diferença entre os resultados pode estar relacionada à natureza química do substrato, sendo o fenol uma molécula muito mais simples em termos químicos do que os corantes usados no trabalho de SILVA (2008).

5.8. Estudo das melhores condições relativas à quantidade de massa de tecido fúngico e tempo de reação para a construção do biossensor

Após o estudo das melhores condições de atuação da enzima tirosinase no tecido fúngico íntegro, o foco do trabalho foi o desenvolvimento do sistema biossensor aliando o biocomponente (tecido fúngico cortado em cubos de 1cm de lado) ao transdutor adequado, baseado no produto da reação biológica, o eletrodo de oxigênio. Os primeiros testes realizados visaram estudar a melhor quantidade do biocomponente e o melhor tempo de reação, onde houvesse menor desvio entre as 5 réplicas realizadas. Abaixo está representa a Tabela 5, onde estão mostradas as médias das 5 réplicas, e o desvio encontrado, realizadas em cada condição utilizando as três quantidades estudadas 1g, 3g e 5g nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de reação.

Tabela 5: Resultados dos testes realizados visaram estudar a melhor quantidade do biocomponente e o melhor tempo de reação, onde se apresentam a média das 5 réplicas realizadas e o respectivo desvio entre elas no tempo que variou de 5 a 30 minutos.

Quantidade de tecido fúngico	**Tempo (minutos)**					
	Variação de O_2					
	5	**10**	**15**	**20**	**25**	**30**
1g	-0,74±0,98	-0,74±1,18	-0,62±1,19	-0,46±1,07	-0,44±1,06	-0,36±1,13
3g	-3,27±0,52	-3,70±0,79	-4,23±0,91	-4,23±1,01	-4,30±1,07	-4,27±1,18
5g	-4,20±0,38	-5,20±0,46	-5,65±0,6	-5,95±0,68	-6,35±0,95	-6,45±1,24

Os resultados supracitados, graficamente presentes na Figura 20, mostram que os menores desvios entre as análises são decorrentes dos menores tempos, 5 minutos, quando se utilizaram as três quantidades do biocomponente. Além disso, pode-se verificar a tendência de aumento numérico da variação de oxigênio dissolvido com o aumento de tempo reacional. Este fato pode ser explicado pelo fato do eletrodo de oxigênio possuir uma membrana que separa o eletrólito interno e os eletrodos (catodo e ânodo) do meio externo. Essa membrana é permeável ao oxigênio que se difunde até o catodo de platina reduzindo-se num processo redox envolvendo 4 elétrons, gerando assim uma corrente proporcional à concentração de oxigênio no meio reacional. Assim, quanto maior for a concentração do substrato na solução a ser analisada (ou solução padrão) e/ou maior o tempo de reação maior será a diminuição observada da concentração de O_2.

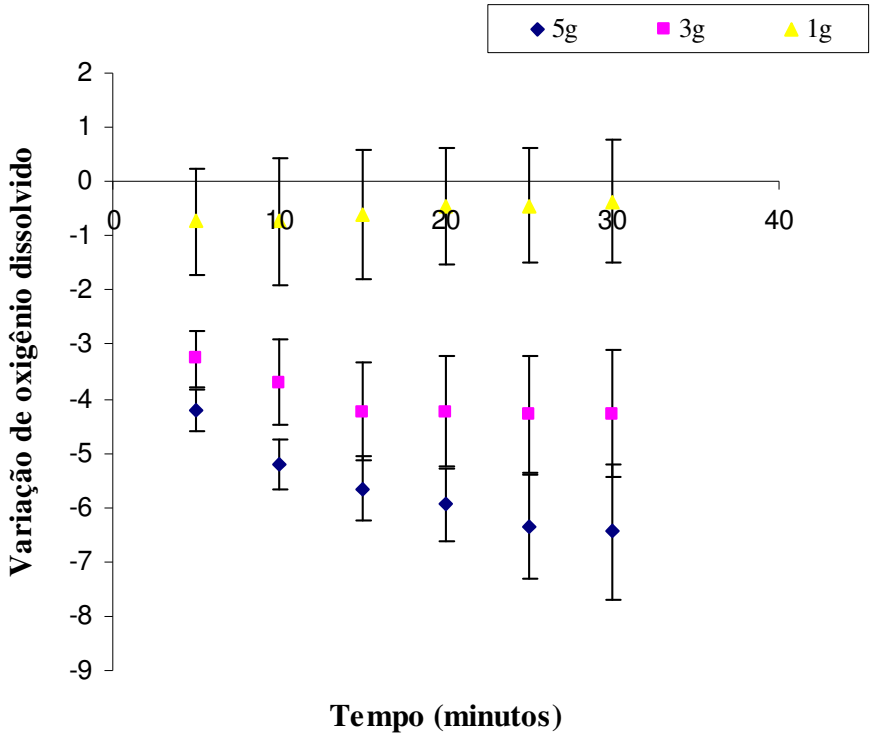

Figura 20: Resultados dos testes visando estudar a melhor quantidade do biocomponente (1g, 3g e 5g) e o melhor tempo de reação que variou de 5 a 30 minutos.

Por este motivo, foram realizados testes em tempos menores: 1, 3 e 5 minutos com as três quantidades testadas 1g, 3g 5g de cogumelo. Os resultados são mostrados na Tabela 6 e graficamente na Figura 21.

Tabela 6: Resultados dos testes realizados visaram estudar a melhor quantidade do biocomponente e o melhor tempo de reação, onde se apresentam a média das 5 réplicas realizadas e o respectivo desvio entre elas no tempo que variou de 1 a 5 minutos.

Quantidade de tecido fúngico	**Tempo (minutos)**		
	Variação de O_2		
	1	**3**	**5**
1g	-0,72±0,34	-2,1±0,43	-2,66±0,55
3g	0,22±0,34	-0,70±0,19	-1,00±0,12
5g	-0,18±0,10	-1,18±0,13	-1,33±0,32

O mesmo perfil das curvas observado na Figura 20 é encontrado na Figura 21, devido ao fato já explicado acima da relação com a reação enzimática de oxidação do fenol pela tirosinase na presença do oxigênio.

Analisando os resultados obtidos com os três menores tempos, observa-se que o sistema que apresenta menor desvio entre as 5 réplicas é quando se utiliza 5g de tecido fúngico em reação de 1 a 3 minutos. A fim de ter um instrumento com maior confiabilidade nas suas análises, foi escolhido usar 5g de tecido e 1 minuto de reação para os testes seguintes.

Na literatura, não existem trabalhos utilizando o tecido de *Agaricus bisporus* íntegro, sendo este normalmente utilizado na sua forma homogeneizada e misturado com outro composto para imobilização. Além disso, o tecido também tem sido usado como fonte da enzima tirosinase extraída. Portanto, a comparação de tempo de reação e quantidade de biocomponente não pode ser feita na sua totalidade.

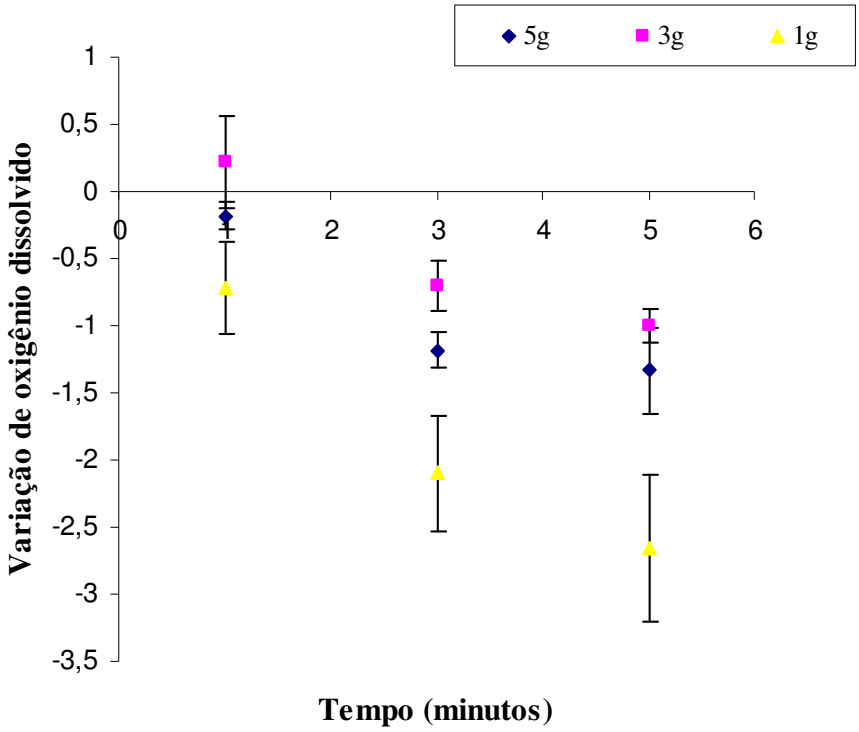

Figura 21: Resultados dos testes visando estudar a melhor quantidade do biocomponente (1g, 3g e 5g) e o melhor tempo de reação que variou de 1 a 5 minutos.

Segundo FATIBELLO-FILHO & VIEIRA (2002), UCHIYAMA *et al.* (1988) desenvolveram um biossensor amperométrico seletivo a catecol utilizando entre 40 e 60mg de tecido de folhas de espinafre (*Spinacea oleracea*) picadas e suportadas por uma membrana de diálise, apresentando um tempo de resposta de 5-10 minutos. Além disso, SIDWELL & RECHNITZ (1985) desenvolveram um biossensor de tecido de banana sensível a dopamina que apresentou um tempo de resposta de 1-3 minutos.

Semelhante ao tempo de resposta escolhido nesse trabalho, OZSOZ *et al.* (*apud* FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2002) usando tecido de cogumelo, ftalocianina de cobalto, pó de grafite e Nujol, construíram um biossensor para compostos fenólicos. O

biossensor apresentou um tempo de resposta de 60 segundos. TOMITA *et al*. (2005) desenvolveram um biossensor amperométrico para ácido ascórbico, usando eletrodo de oxigênio como transdutor, onde o melhor tempo de resposta foi de 60 segundos e o tempo de estabilização também foi de 60 segundos. Já CAMPANELLA *et al*. (1993), usando 3mg de tirosinase colocados sob o eletrodo de oxigênio do tipo Clark, obtiveram um tempo de resposta de 2 minutos.

No entanto, existem na literatura trabalhos onde o tempo de resposta do biossensor foi na ordem de vários minutos, como TIMUR *et al*. (2004) e ABDULLAH *et al*. (2006), desenvolvendo seus respectivos biossensores para detecção de compostos fenólicos, onde o tempo de resposta foi de 5 minutos. ASAV *et al*. (2008) montando um biossensor baseado na inibição enzimática para detecção de fluoreto acharam como melhor tempo de resposta, 3 minutos. Além disso, SEZGINTÜRK *et al*. (2005), em todas as performances do biossensor para ácido benzóico desenvolvidas, tiveram 20 minutos como tempo de resposta.

5.9. Estudos de repetibilidade do sistema biossensor (eletrodo de oxigênio e tecido fúngico) e análise da influência e necessidade de lavagem do eletrodo de oxigênio a cada leitura

Após a definição do tempo de resposta do sistema biossensor montado, estudos foram realizados visando avaliar a repetibilidade do mesmo e, concomitantemente, a

influência da lavagem do transdutor entre as leituras. Estes dois fatores são muito importantes na construção da curva de resposta do instrumento em elaboração por garantir precisão e confiabilidade do aparato analítico proposto.

As curvas de calibração mostradas nas Figuras 22 e 23 foram traçadas usando um conjunto de pontos experimentais obtidos observando o sinal de saída do transdutor (eletrodo de oxigênio) para um determinado valor do sinal de entrada (faixa de concentração fenólica de 0 a 5ppm). O objetivo foi estudar se o método de análise desenvolvido tinha mesma faixa linear do teste colorimétrico (APHA, 1992). A linearidade das respostas indica que há uma relação direta entre o *input* (concentração de fenol) e *output* (sinal do eletrodo de oxigênio).

Através das curvas obtidas, pode-se verificar que não houve resposta dentro da faixa de concentração de fenol estudada e a repetibilidade dos dados usando o mesmo tecido fúngico de 1,0cm^3 sob as condições escolhidas durante o trabalho. Além disso, observa-se que o processo de lavagem não proporcionou melhor resposta do sistema biossensor proposto. Desta forma, conclui-se que esta configuração nas condições estudadas não foi a ideal para o desenvolvimento do biossensor.

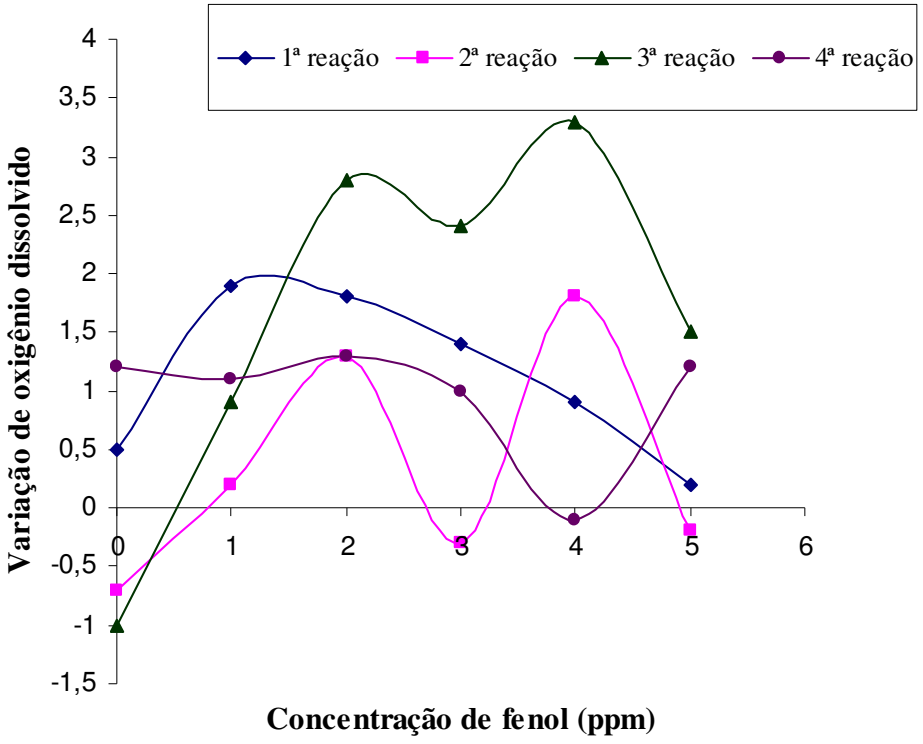

Figura 22: Teste de repetibilidade das análises usando o mesmo pedaço de tecido fúngico de 1,0cm^3 com lavagem do eletrodo de oxigênio entre as leituras.

A falta de repetibilidade pode ser devido à formação de melaninas nos interstícios do tecido fúngico usado, fato constatado pelo escurecimento do mesmo. A formação desses produtos de condensação das quinonas leva a aumentos consideráveis do tempo de resposta do biossensor e principalmente à diminuição da sensibilidade do mesmo, uma vez que o polímero formado bloqueia os interstícios da camada biológica do biossensor, dificultando a difusão do analito e também causa diminuição da atividade catalítica da enzima, tirosinase, presente no tecido fúngico (FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2002).

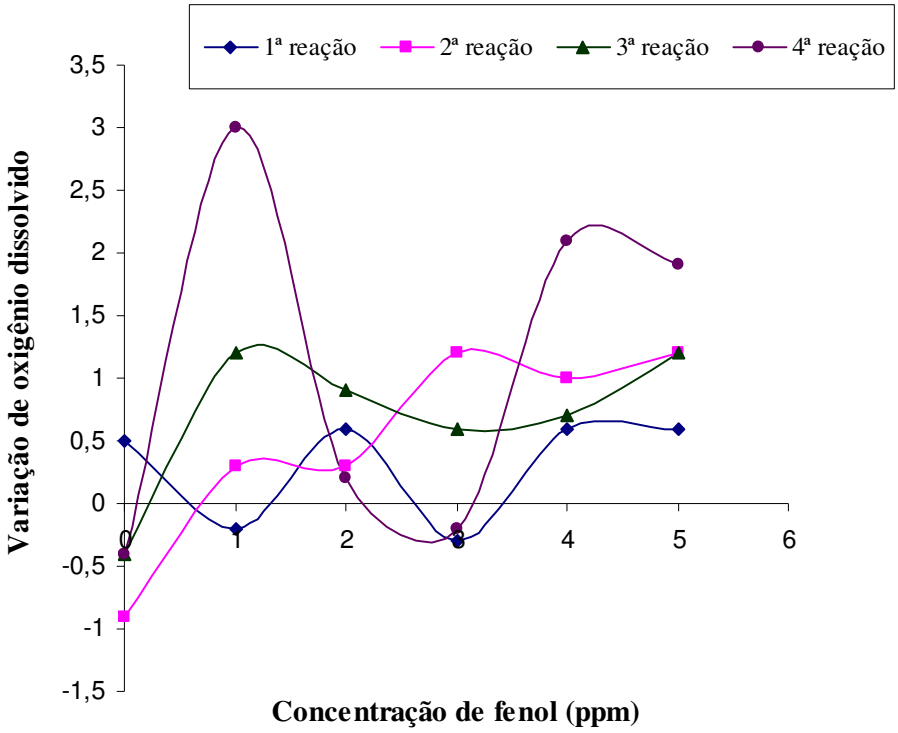

Figura 23: Teste de repetibilidade das análises usando o mesmo pedaço de tecido fúngico de 1,0cm^3 sem lavagem do eletrodo de oxigênio entre as leituras.

Ao contrário do que aconteceu neste trabalho, onde não houve repetibilidade das análises, existem trabalhos na literatura que estudaram o desenvolvimento de biossensor utilizando o mesmo tecido do macrofungo adotado neste trabalho, porém na sua forma homogeneizada, e o eletrodo de oxigênio como transdutor. Neste contexto, os resultados de SEZGINTÜRK *et al.* (2005) mostraram que o biossensor proposto trabalhou sem diminuição da atividade após 10 medições. A repetibilidade do biossensor de TOPÇU *et al*. (2004) foi testada através da repetição do experimento por oito vezes, encontrando o valor baixíssimo de ± 0,002mM como desvio padrão. AKYILMAZ & DINCKAYA

(2000) estudaram a repetibilidade do instrumento através da execução de dez repetições, encontrando um valor de desvio padrão de ± 0, 23mM.

Em relação aos trabalhos de SILVA (2008) e KAMEDA (2003) que utilizam o tecido íntegro cortado em pedaços de 0,5cm^3, ambos autores encontraram que, após quatro repetições, há diminuição do percentual de remoção de cor e fenol no efluente sintético, respectivamente.

5.10. Testes de estudo da influência da saturação inicial das soluções em relação ao oxigênio dissolvido, nas leituras do eletrodo de oxigênio

Como a configuração inicial não promoveu resposta linear na faixa estudada, 0 a 5ppm, tentou-se fazer algumas alterações, como: borbulhar ar na amostra por 5 minutos (SILVA, 2008) antes da leitura do tempo inicial pelo eletrodo de oxigênio e aumentar a faixa de estudo, passando a de 0 a 10ppm de fenol.

Os resultados do estudo comparativo para verificação da influência do borbulhamento de ar antes das leituras do "teste em branco", isto é, quando não se adicionou o biocomponente ao sistema, são mostrados na Figura 24.

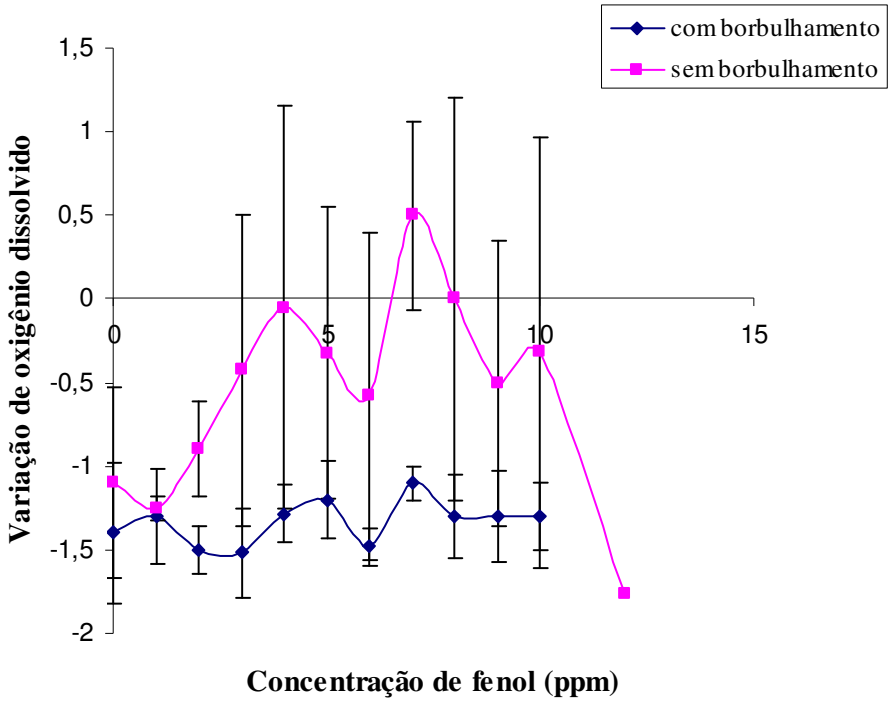

Figura 24: Testes comparativos de influência do borbulhamento de ar antes das leituras com o eletrodo de oxigênio, onde não houve presença do tecido fúngico e nem procedimento de lavagem do eletrodo.

Como era esperado, o procedimento de borbulhamento promoveu menores variações e erros entre as leituras ao longo da faixa de concentração de fenol estudada. Com isso, esperava-se que as respostas com a adição do biocomponente após o borbulhamento de ar nas soluções padrão fossem mais coerentes e com melhor repetibilidade. Os resultados dos testes preliminares são mostrados na Figura 25.

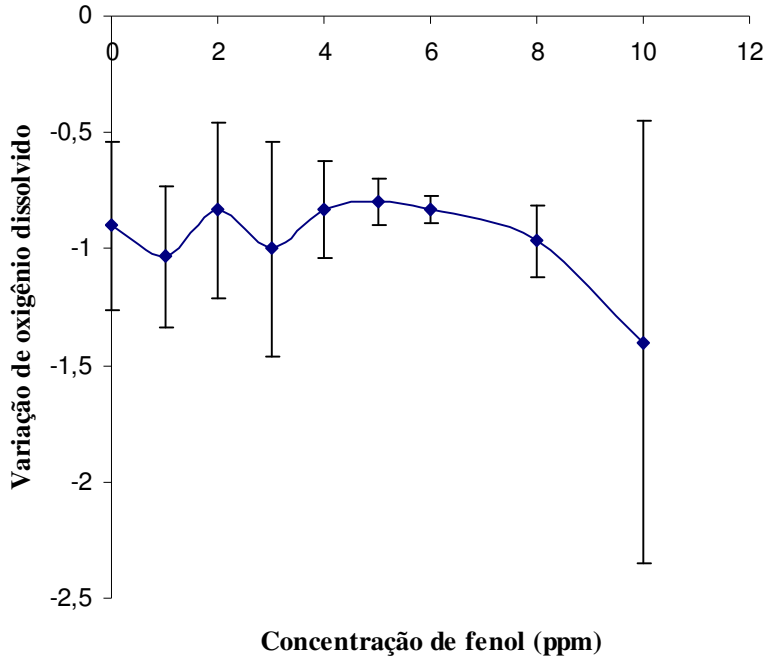

Figura 25: Resultado dos primeiros testes visando construir a curva de calibração do sistema biossensor montado usando 5g de tecido fúngico de 1,0cm^3; temperatura ambiente; pH 8,0; sem lavagem do transdutor; borbulhamento de ar antes das leituras; faixa do analito de 0 a 10ppm; e tempo de reação de 1 minuto.

Como pode ser observado, apesar do desvio padrão ser maior em algumas leituras, existe uma tendência de aumento da variação de oxigênio com o aumento da concentração de fenol da solução padrão de análise, a partir de 4ppm. Desta forma, os testes subseqüentes foram realizados na faixa de 3 a 10ppm. Os resultados são mostrados na Figura 26.

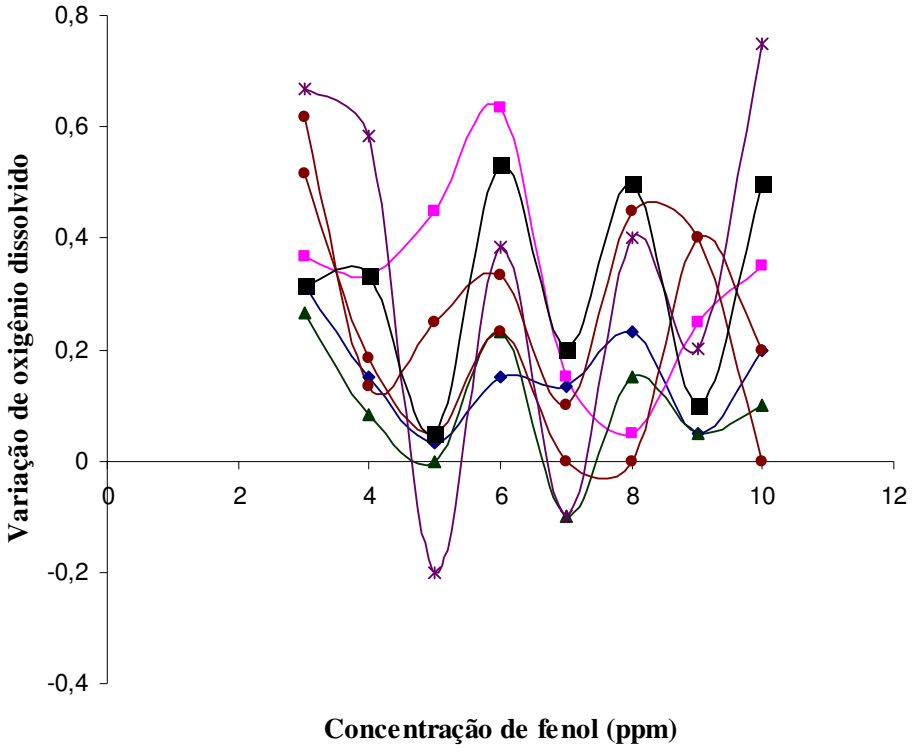

Figura 26: Testes realizados para construir a curva de calibração do sistema biossensor montado usando 5g de tecido fúngico de 1,0cm^3; temperatura ambiente; pH 8,0; sem lavagem do transdutor; borbulhamento de ar antes das leituras; faixa de fenol de 3 a 10ppm; e tempo de reação de 1 minuto. Cada curva está relacionada a pedaços de tecido fúngico diferentes.

Assim como ocorreu nos resultados dos testes mostrados no item 5.9, não se percebeu uma relação entre a variação da concentração de oxigênio dissolvido e a concentração de fenol. Portanto, mesmo com o procedimento de borbulhamento de ar antes das análises e o aumento da faixa de fenol estudada, a configuração proposta para um biossensor amperométrico de fenol não promoveu resultados positivos nas condições testadas.

Como o sistema biossensor montado não promover resposta, testou-se também as duas outras melhores condições de quantidade do biocomponente e tempo de reação encontradas no presente trabalho. As Figuras 27 e 28 mostram as curvas de calibração geradas quando se utilizou 3g de tecido fúngico e 5 minutos de reação e, 5g do macrofungo e 3 minutos de reação, respectivamente.

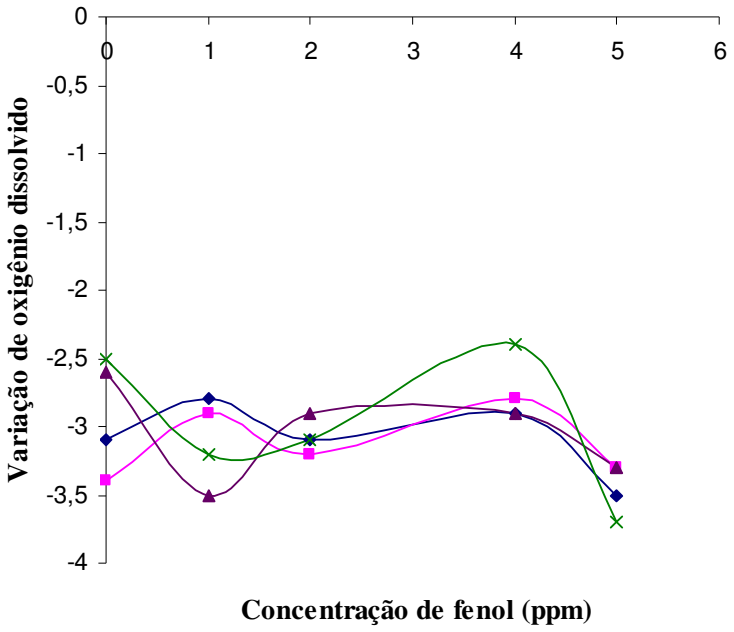

Figura 27: Testes realizados para construir a curva de calibração do sistema biossensor montado usando 3g de tecido fúngico de 1,0cm^3; temperatura ambiente; pH 8,0; sem lavagem do transdutor; borbulhamento de ar antes das leituras; faixa de fenol de 0 a 5ppm; e tempo de reação de 5 minutos. Cada curva está relacionada a pedaços de tecido fúngico diferentes.

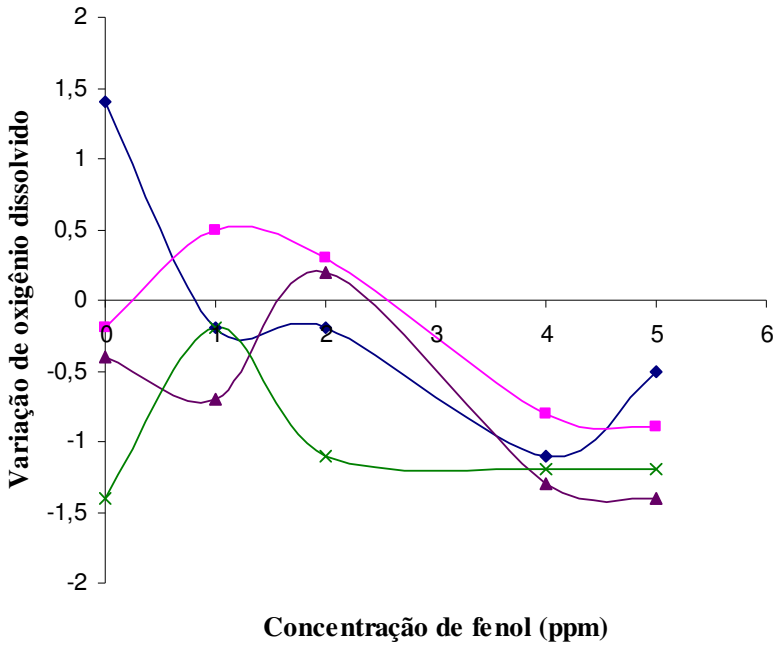

Figura 28: Testes realizados para construir a curva de calibração do sistema biossensor montado usando 5g de tecido fúngico de 1,0cm^3; temperatura ambiente; pH 8,0; sem lavagem do transdutor; borbulhamento de ar antes das leituras; faixa de fenol de 0 a 5ppm; e tempo de reação de 3 minutos. Cada curva está relacionada a pedaços de tecido fúngico diferentes.

Assim, como ocorrido nas curvas mostradas na Figura 26, as duas novas tentativas também não geraram resposta quando se visou encontrar uma relação entre a concentração de fenol e a variação de oxigênio dissolvido.

Vale ressaltar que o problema de baixa reprodutibilidade das características analíticas dos biossensores que utilizam tecido fúngico e vegetal é relatado na literatura por FATIBELLO-FILHO & VIEIRA (2002), se agravando quando se tratam de polifenol oxidases devido a formação das quinonas que promovem diminuição na sensibilidade do sistema. Além disso, ROSSATO *et al*. (2001) falam que biossensores que utilizam

eletrodo do oxigênio do tipo Clark apresentam a desvantagem de terem sua resposta influenciada por flutuações na concentração de oxigênio dissolvido resultantes de variações de pH, temperatura, força iônica ou pressão parcial. Portanto, percebe-se que desenvolver um instrumento que utilize tecido fúngico e eletrodo de oxigênio como transdutor é uma tarefa difícil por estar suscetível a grande influencia externa e dos próprios compostos inerentes ao biocomponente.

5.11. Estudos de estabilidade do sistema biossensor montado: eletrodo de oxigênio e tecido fúngico

Para estudar a estabilidade do sistema biossensor montado, os 5g do tecido fúngico de *Agaricus bisporus* foram reutilizados ao longo dos dias. A cada dia foi conduzido um experimento e, de um dia para o outro, os pedaços de cogumelo foram conservados em geladeira a 4ºC dentro de recipientes fechados. Os resultados são mostrados nas Figuras 29, 30 e 31, onde cada uma está relacionada a um lote diferente do material de estudo.

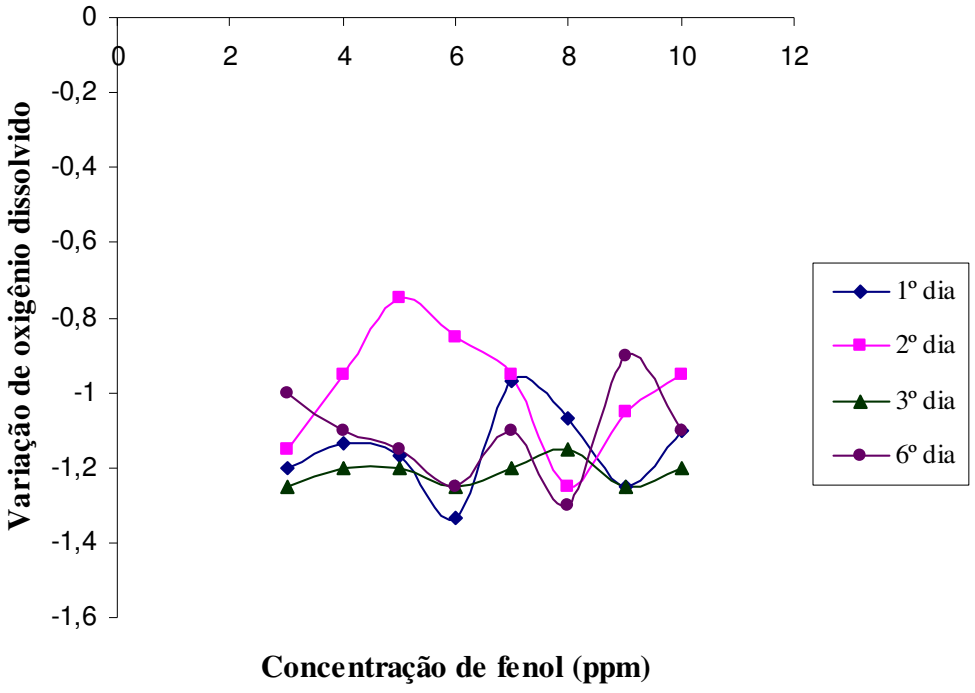

Figura 29: Estudo da estabilidade usando os mesmos 5g de tecido fúngico ao longo dos dias usando 5g de tecido fúngico de 1,0cm^3; temperatura ambiente; pH 8,0; sem lavagem do transdutor; borbulhamento de ar antes das leituras; faixa de fenol de 3 a 10ppm; e tempo de reação de 1 minuto.

Como visto na Figura 29, e também nas Figuras 30 e 31, os resultados mostram que não há relação entre as curvas de calibração ao longo dos dias, assim como ocorre nos testes de repetibilidade. O motivo para isso deve ser o mesmo do descrito no item 5.9, onde se explica a possível formação de quinonas nos interstícios do tecido fúngico íntegro. Além disso, o efeito do envelhecimento do cogumelo também pode ser responsável pela ausência de estabilidade do biossensor.

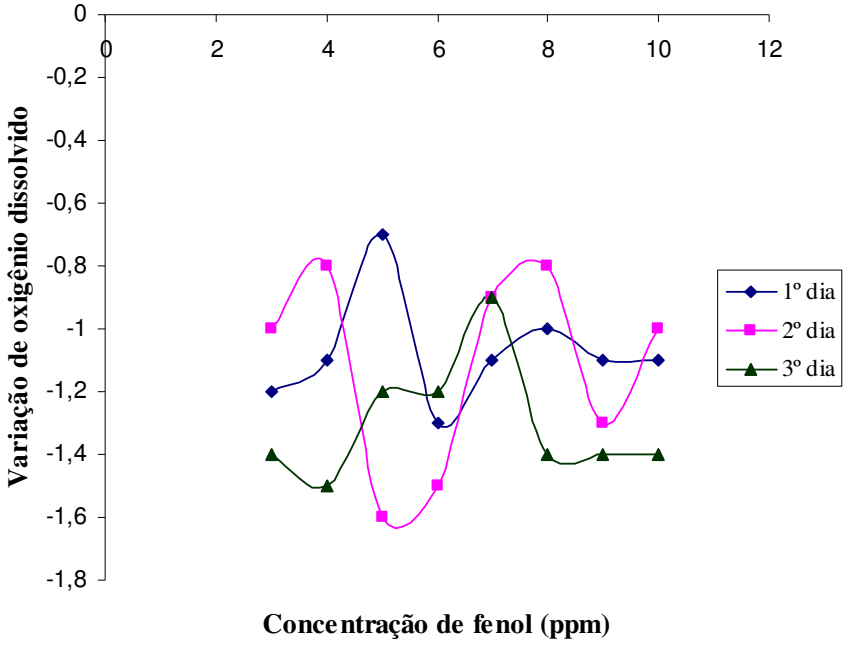

Figura 30: Estudo da estabilidade usando os mesmos 5g de tecido fúngico ao longo dos dias usando 5g de tecido fúngico de 1,0cm^3; temperatura ambiente; pH 8,0; sem lavagem do transdutor; borbulhamento de ar antes das leituras; faixa de fenol de 3 a 10ppm; e tempo de reação de 1 minuto.

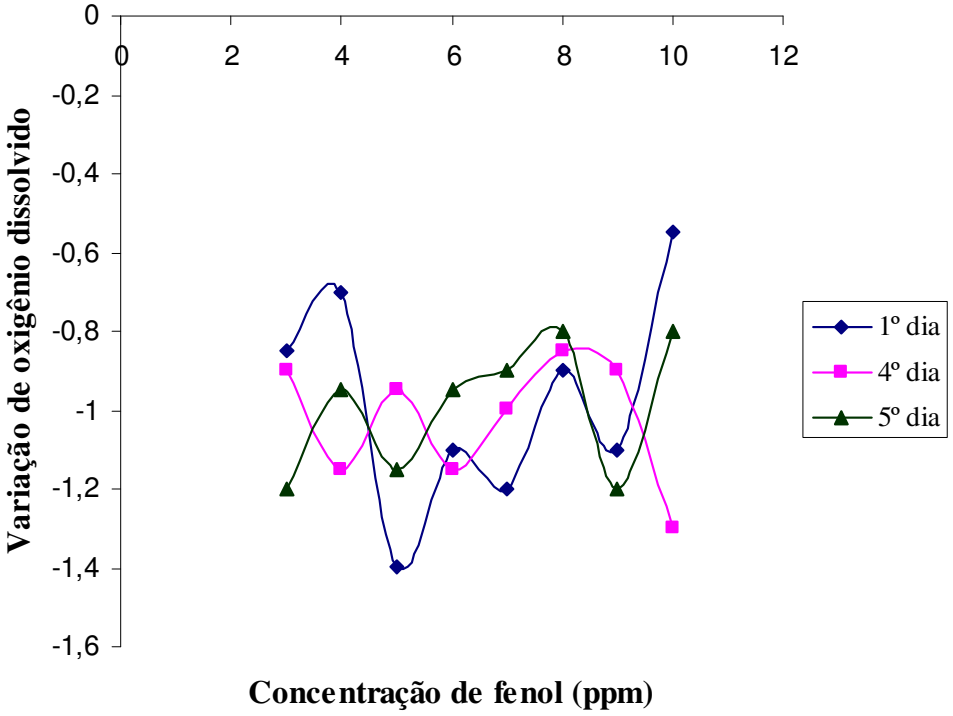

Figura 31: Estudo da estabilidade usando os mesmos 5g de tecido fúngico ao longo dos dias usando 5g de tecido fúngico de 1,0cm^3; temperatura ambiente; pH 8,0; sem lavagem do transdutor; borbulhamento de ar antes das leituras; faixa de fenol de 3 a 10ppm; e tempo de reação de 1 minuto.

Devido aos resultados negativos para a estabilidade logo nos primeiros dias, não foram feitos testes com mais dias de estocagem em geladeira. Além disso, após 20 dias de comprados e estocados em geladeira, os pedaços de cogumelo começaram a apodrecer.

A investigação da estabilidade operacional do biossensor, de tecido fúngico homogeneizado e eletrodo de oxigênio, feita por SEZGINTÜRK & DINÇKAYA (2008) mostrou que não houve diminuição da atividade ao final da sétima medição com o instrumento. Além disso, na décima medição e na décima terceira, este só perdeu 16% e 31% de sua atividade inicial, respectivamente.

Assim como descrito no trabalho de SEZGINTÜRK & DINÇKAYA (2008), a maioria dos trabalhos presentes na literatura, que utilizam os mesmos biocomponente e transdutor usados nesse trabalho, costuma apresentar estabilidade por no máximo um mês, visto que ocorre desnaturação ou inibição das enzimas presente no tecido decorrente do procedimento de estocagem (TOPÇU *et al*., 2004).

CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES

Por ser uma excelente fonte de enzima tirosinase, os corpos de frutificação do macrofungo *Agaricus bisporus* têm sido bastante estudados como um possível biocomponente de biossensores para análise de compostos fenólicos. A partir dos resultados obtidos durante este trabalho, podem ser tiradas as seguintes conclusões descritas a seguir:

1. O processo de re-extração enzimática da pasta de cogumelo promoveu um aumento significativo (11,11% a 150%.) do primeiro para o segundo extrato;
2. O envelhecimento do cogumelo promoveu aumento no percentual de remoção de fenol, sendo que no caso específico de 15 dias, houve um aumento significativo na remoção de fenol de 12,1%;
3. A possível ocorrência da remoção do fenol por adsorção no tecido fúngico foi descartada, já que nos resultados obtidos, neste trabalho, isto não foi evidenciado;
4. O tamanho médio, 1,0cm^3, foi escolhido para os testes subseqüentes, pois promoveu remoção fenol de 62,5% e menor discrepância entre as réplicas se comparado com o tamanho pequeno (0,5cm^3);
5. O tecido fúngico do tamanho de 1,0cm^3 apresentou em sua composição aproximadamente 0,306ppm de fenol;
6. O aumento da temperatura promoveu aumento no percentual de remoção de fenol por parte do biocomponente. Os maiores valores de remoção de fenol foram encontrados quando os testes foram conduzidos a 40°C. Porém, devido aos

desvios associados, considerou-se como uma faixa de melhor atuação da tirosinase presente no tecido fúngico íntegro: 35°C a 45°C;

7. O pH 8,0 promoveu os melhores percentuais de remoção de fenol, visto que as curvas de remoção obtidas com o pH nos valores de 6,0 e 7,0 foram pouco coerentes, provavelmente devido ao método colorimétrico de dosagem escolhido;
8. Para a montagem do sistema biossensor: tecido fúngico e eletrodo de oxigênio, sob as condições escolhidas, a melhor quantidade do biocomponente foi de 5g e o tempo de resposta escolhido foi de 1 minuto;
9. O procedimento de lavagem do eletrodo de oxigênio entre as análises não interferiu positivamente na resposta;
10. Nos testes para definição da curva de calibração do biossensor, não foi encontrada relação entre a variação da concentração de oxigênio e a concentração de fenol das amostras padrão;
11. A etapa de borbulhamento de ar, por 5 minutos antes da leitura das soluções padrão pelo eletrodo de oxigênio, promoveu menor variação entre as leituras do "teste em branco", isto é, quando não se utilizou tecido fúngico;
12. Não foi observada repetibilidade do sistema montado, assim como sua estabilidade.

CAPÍTULO 7. SUGESTÕES

- Como a configuração testada neste trabalho não apresentou resultados coerentes, seria interessante testar futuramente a utilização do biocomponente em um outra forma alternativa, a fim de minimizar os efeitos da deposição das quinonas nos seus interstícios. Uma estratégia interessante seria a sua utilização na forma liofilizada ou em pasta homegeneizada;
- Outra sugestão seria variar as condições aplicadas visando otimizar o sistema montado, como por exemplo confinar o biocomponente, de modo que interferências pudessem ser minimizadas, e assim, buscar uma linearidade entre a variação de oxigênio dissolvido e a faixa de concentração de fenol de estudo;
- Verificar se a utilização da melhor temperatura onde foram encontrados os maiores valores de remoção de fenol no atual trabalho, 40°C, promove uma curva de calibração linear do sistema montado, onde para isso, seria necessário montar um aparato que promovesse o aquecimento da solução antes da sua utilização, pensando em um biossensor que pudesse ser aplicado continuamente;
- Estudo da melhor maneira de acoplamento do tecido fúngico ao transdutor (eletrodo de oxigênio), visando a real construção de um biossensor;

- Verificar a possível utilização de outros sistemas de transdução capazes de captar alguma variação causada pela atividade tirosinásica do tecido fúngico, como por exemplo análise espectrofotométrica;
- Com o biossensor ideal para fenol, desenvolver testes com amostras reais para verificação de possíveis interferentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, J., AHMAD, M., KARUPPIAH, N., HENG, L. Y., SIDEK, H. (2006) Immobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of phenol. *Sensors and Actuators B*, v. 114, pp. 604-609.

AKYILMAZ, E., DINCKAYA, E. (2000) A mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate based alcohol oxidase electrode for alcohol determination in serum. *Talanta*, v. 53, pp. 505–509.

ALFAYA, A. A. S., KUBOTA, L. T. A. (2008) Utilização de materiais pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Química Nova*, v. 25, n. 5, pp. 835-841.

APHA. (1992) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 18th ed. *American Public Health Association*, Inc. New York.

ARAUJO, R. F. F. (2006) Aplicação de polímeros como matrizes no desenvolvimento de biossensores e na purificação de proteínas. Tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

ARNOLD, M. A., RECHNITZ, G. A. (1987) Biosensors based on plant and animal tissue. In *Biosensors: Fundamentals and Applications*; Turner, A. P. F., Karube, I., Wilson, G. S., Eds.; Oxford University Press; New York, pp. 30-59.

ARYA, S. K., DATTA, M., MALHOTRA, B. D. (2008) Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 23, pp. 1083-1100.

ASAV, E., YORGANCI, E., AKYILMAZ, E. (2008) An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*, doi:10.1016/j.talanta.2008.12.010.

ATLOW, S. C., BONADONNA-APARO, L., KLIBANOV, A. M. (1984) Dephenolization of industrial wastewaters catalyzed by polyphenol oxidase. *Biotechnology and Bioengineering,* v. 26, pp. 599-603.

BARROS, L., FALCÃO, S., BAPTISTA, P., FREIRE, C., VILAS-BOAS, M., FERREIRA, I. C. F. R. (2008) Antioxidant activity of Agaricus sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry*, v.111, pp. 61-66.

BEVILAQUA, J. V. (2000): Utilização de Tirosinase de *Agaricus bispora* no Tratamento de Efluente Contendo Fenóis. Tese de Mestrado - COPPE -Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

BURTON, S. G., BOSHOFF, A., EDWARDS, W., ROSE, P. D. (1998) Biotransformation of phenols using immobilised polyphenol oxidase. *Journal* of *Molecular Catalysis a: Enzymatic,* v. 5, pp. 411-416.

CAMPANELLA, L., BEONE, T., SAMMARTINO, M. P., TOMASSETTI, M. (1993) Determination of phenol in wastes and water using an enzyme sensor. *Analyst*, August, v. 118, pp.979-986.

CAMPANELLA, L., NUCCILLI, A., TOMASSETTI, M., VECCHIO, S. (2008) Biosensor analysis for the kinetic study of polyphenols deterioration during the forced thermal oxidation of extra-virgin olive oil. *Talanta*, v. 74, pp. 1287–1298.

CAMPOS, C. F., SOUZA, P. E. A., COELHO, J. V., GLORIA, M. B. A. (1996) Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of green coconut water. *Journal of Food Processing and Preservation,* v. 20, pp. 487-500.

CARRALERO, V., MENA, M. L., GONZALEZ-CORTÉS, A., YÁÑEZ-SEDEÑO, P., PINGARRÓN, J. M. (2006) Development of a high analytical performance-tyrosinase biosensor based on a composite graphite-Teflon electrode modified with gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, pp. 730–736.

CESTARI, A. R., VIEIRA, E. F. S., NASCIMENTO, A. J. P., FILHA, M. M. S., AIROLDI, C. (2002) Factorial design evaluation of some experimental factors for phenols oxidation using crude extracts from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 13, n. 2, pp. 260-265.

CLUBE DE ENGENHARIA. Disponível em: <http://www.clubedeengenharia.org.br/>. Acesso: 18/12/2008.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (2005). Resoluções CONAMA 357. Brasília, Brasil.

COOKSEY, C. J., GARRATT, P. J., LAND, E. J., PAVEL, S., RAMSDEN, C. A., RILEY, P. A., SMIT, N. P. (1997) Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry,* v. 272, n. 42, pp. 26226-26235.

DANIELSSON, B., MANDENIUS, C. F., WINQUIST, F., MATTIASSON, B., NILSSON, H., MOSBACH, K. (1981) Fermenter monitoring and control by enzyme thermistors, *Advances in Biotechnology,* v. 1, pp. 445-453.

DANTONI, P., SERRANO, S. H. P., BRETT, A. M. O., GUTZ, I. G. R. (1998) Flow-injection determination of catechol with a new tyrosinase/DNA biosensor. Analytica Chimica Acta, v. 366, n. 1-3, pp. 137-145.

DEC, J., BOLLAG, J. M. (1994) Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, pp. 1132-1139.

D'ORAZIO, P. (2003) Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chim. Acta*, v. 334, pp. 41-69.

D'SOUZA, S. F. (2001) Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, pp. 337-353.

DU, P., ZHOU, B., CAI, C. (2008) Development of an amperometric biosensor for glucose based on electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at the single-walled carbon nanotube/nile blue A nanocomposite modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 614, pp. 149–156.

DURÁN, N., ESPOSITO, E. (2000) Potencial applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 30, pp. 953-971.

ESPÍN, J. C., WICHERS, H. J. (1999) Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *Journal Agric. Food. Chem.*, v. 47, pp. 3518-3525.

FARIA, R. O. (2008) Análise de polissacarídeos e tirosinase de Lentinula boryana (Berk & Mont) Pegler: um macrofungo com potencial biotecnológico. Tese de doutorado do programa de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FARIA, R. O., MOURE, V. R., AMAZONAS, M. A. L. A., KRIEGER, N., MITCHELL, D. A. (2007) The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 45, n. 3, pp. 287-294.

FATIBELO-FILHO, O., VIEIRA, I. C. (2002) Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, v. 25, n. 3, pp. 455-464.

FENOLL, L. G., RODRGUEZ-LOPEZ, J. N., GARCA-SEVILLA, F., GARCA-RUIZ, P. A., VARON, R., GARCA-CANOVAS, F., TUDELA, J. (2001) Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable *o*-quinones. *Biochimica et Biophysica Acta/Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1548, pp. 1-22.

FERNANDES, E. G. R. (2005) Biossensores nanoestruturados para monitoração de glicose. Dissertação de Mestrado em Ciências dos Materiais para Engenharia, Universidade Federal de Itajubá, MG, Brasil.

FERNANDES, R. (2005) Adsorventes alternativos para remoção de fenol em solução aquosa. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

FREIRE, R. S., DURÁN, N., KUBOTA, L. T. (2002) Electrochemical biosensor-based devices for continuos phenols monitoring in environmental matrices. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.13, n. 4, pp. 456-462.

GOOGLE IMAGES. Disponível em: <http://images.google.com.br/>. Acesso: 08/09/2008.

HOIRE, H., RECHNITZ, G. A. (1995) Hybrid tissue/enzyme biosensor for pectin. *Analytica Chimica Acta*, v. 306, pp. 123-127.

HUANG, Y., WU, F. (2006) Plant tissue-based chemiluminescence biosensor for ethanol. *Analytical Sciences*, v. 22, July, pp. 965-969.

INGEBRIGTSEN, J., KANG, B., FLURKEY, W. H. (1989) Tyrosinase activity and isoenzymes in developing mushrooms. *Journal of Food Science,* v. 54, n. 1, pp. 128-131.

KAMEDA, E. (2003) Estudo do processo de obtenção de extrato enzimático de *Agaricus bisporus* para remoção de fenol em efluente sintético. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

KARUBE, I., NOMURA, Y. (2000) Enzyme sensors for environmental analysis. *Journal of Molecular Catalysis B*, v. 10, pp. 177-181.

KENNA, A. (1999) Sensor market goes global. *Intech*, v. 6, pp. 40-43.

KIM, G. Y., CUONG, N. M., CHO, S. H., SHIM, J., WOO, J. J., MOON, S. H. (2007) Improvement of an enzyme electrode by poly(vinyl alcohol) coating for amperometric measurement of phenol. *Talanta*, v. 71, pp. 129-135.

KOCHANA, J., GALA, A., PARCZEWSKI, A., ADAMSKI, J. (2008a) Titania sol-gel-derived tyrosinase-based amperometric biosensor for determination of phenolic compounds in water samples. Examination of interference effects. *Anal. Bioanal. Chem*, v. 391, pp. 1275-1281.

KOCHANA, J., NOWAK, P., JAROSZ-WILKOŁAZKA, A., BIEROŃ, B. (2008b) Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal*, v. 89, pp. 171-174.

LEE, S., HONG, S., SUNG, M. (1996) Removal and bioconversion of phenol in wastewater by a thermostable β–tyrosinase. Enzyme and Microbial Technology, v. 19, pp. 374-377.

LOUZADA, E. S., LUCCAS, P. O., MAGALHÃES, C. S. (2004) Construção e caracterização de um biossensor potenciométrico para determinação de pirogalol. *Revista Analytica*, Junho/Julho, n. 11, pp. 52-56.

MANAHAN, S. E. (1994) Environmental Chemistry 6th ed. Boca Raton: Lewis Publishers 811 p.

MARÍN-ZAMORA, M. E., ROJAS-MELGAREJO, F., GARCÍA-CÁNOVAS, F., GARCÍA-RUIZ, P. A. (2006) Direct immobilization of tyrosinase enzyme from natural mushrooms (*Agaricus bisporus*) on D-sorbitol cinnamic ester. *Journal of Biotechnology*, v. 126, n. 3, pp. 295-303.

MATSUMOTO, K., YAMADA, K., OSAJIMA, Y. (1981) In: *Analytical Chemistry*, pp. 53.

MELO, A. F. (2008) Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MELLO, L. D., KUBOTA, L. T. (2002) Review of the use of biosensor as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, v. 77, pp. 237-256.

MELLO, L. D., KUBOTA, L. T. (2007) Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. *Talanta*, v. 72, pp. 335–348.

NISTOR, C., EMNEUS, J., GORTON, L., CIUCU, A. (1999) Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds. *Analytica Chimica Acta*, v. 387, n. 3, pp. 309-326.

OLIVEIRA, I. R. W. Z., VIEIRA, I. C. (2006) Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. *Química. Nova,* v. 29, n. 5, pp. 932-939.

PAPA, G., PESSIONE, E., LEONE, V., GIUNTA, C. (1994) *Agaricus bisporus* tyrosinase [monophenol monooxygenase] - I. Progress made in preparative methods *International Journal of Biochemistry,* v. 26, n. 2, pp. 215-221.

PASSOS, C. T. (2006) Estudo da biodegradação do fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp..Dissertação de mestrado do programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Fundação Universidade do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS.

PATACAS, R. C. (2007) Desenvolvimento, caracterização e optimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal.

PEREZ, E. F. (2000) Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para oxalato. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

PINTO, A. C. S., SALGADO, A. M., COELHO, M. A. Z. (2007) Otimização das condições de reação de um biossensor de uréia usando tecido vegetal de feijão de porco imobilizado em membrana de nylon. XVI SINAFERM – Simpósio Nacional de Bioprocessos, Curitiba. Anais, v. 1. pp. 312.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. (2001) Biologia Vegetal, 6ª ed, Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan.

RODRIGUES, K. A., SAMPAIO, G. M. M. S., ZAIAT, M., SANTAELLA, S. T. (2007) The influence of glucose on the phenol consumption by Aspergillus niger an 400 in batch reactors. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 12, n. 2 (Abril/Junho), pp. 222-228

ROMANI, A., MINUNNI, M., MULINACCI, N., PINELLI, P., VINCIERI, F. F. (2000) Comparison among differential pulse voltammetry, amperometric bisensor, and HPLC/DAD analysis for polyphenol determination. *Journal Agric. Food Chem*, v. 48, pp. 1197-1203.

ROS, J. R., RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N., GARCIA-CANOVAS, F. (1994) Tyrosinase: kinetics analysis of transient phase and steady state. *Biochimica et Biophysica Acta,* v. 1204, pp. 33-42, 1994.

ROSA, L. H. (2007) Dossiê técnico: cultivo de cogumelos comestíveis. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, CETEC, Maio.

ROSATTO, S. S. (2000) Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e silica modificada. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

ROSATTO, S. S., FREIRE, R. S., DURÁN, N., KUBOTA, L. T. (2001) Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova*, v. 24, n. 1, pp. 77-86.

SALGADO, A. M. (2001) Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

SANCHEZ-FERRER, A., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N., GARCÍA-CÁNOVAS, F., GARCÍA-CARMONA, F. (1995) Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et BiophysicaActa,* v. 1247, pp.1-11.

SANTOS, L. G. (2005) Resposta técnica: Ministério da Ciência e Tecnologia, Rio Grande do Sul, SENAI/RS – Departamento Regional.

SANTOS DE ARAUJO, B., DEC, J., BOLLAG, J. M., PLETSCH, M. (2006) Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Chemosphere*, v.63, n. 4, pp. 642-651.

SEO, S. Y., SHARMA, V. K., SHARMA, N. (2003) Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry***,** v. 51, n. 10, pp. 2837-2853.

SEZGINTÛRK, M. K., GÔKTUG, T., DINÇKAYA, E. (2005) Detection of benzoic acid by an amperometric inhibitor biosensor based on mushroom tissue homogenate. *Food Technol. Biotechnol*., v. 43, n. 4, pp. 329-334.

SEZGINTÛRK, M. K., DINÇKAYA, E. (2008) Development of a biosensor for controlling of Thiourea in fruit juices. *Food and Bioprocess Technology*.

SHAN, D., LI, Q., XUE, H., COSNIER, S. (2008) A highly reversible and sensitive tyrosinase inhibition-based amperometric biosensor for benzoic acid monitoring. *Sensors and Actuators B*, v. 134, pp. 1016-1021.

SHARMAT, F., ROGERS, K. (1994): "Article review - Biosensors", *Meas Sci. Technology*, v. 5, pp. 461-472.

SIGNORI, C.A., FATIBELLO-FILHO, O. (1994) Biossensor amperométrico de fenóis usando extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorhiza*). *Química Nova*, v. 17, n. 1, pp. 38.

SILVA, I. E. C., LUDWIG, K. V. F., NEUMANN, D., SCHNEIDER, A. C., ONOFRE, S. B. (2007) Fungos filamentosos degradadores de compostos fenólicos isolados de águas residuárias de postos de combustíveis. *Revista de Biologia e Saúde da UNISEP, Biology & Health Journal*, v. 1, n. 1-2, pp. 101-108.

SILVA, R. L. L. (2008) Remoção de cor de efluente sintético com cogumelos *Agaricus bispora*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SMIDERLE, F. R. (2008) Caracterização estrutural de alguns polissacarídeos presentes no basidioma de *Pleurotus pulmonarius* e aplicações. Dissertação de Mestrado do curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

TEMBE, S., INAMDAR, S., HARAM, S., KARVE, M., D'SOUZA, S. F. (2007) Electrochemical biosensor for catechol using agarose–guar gum entrapped tyrosinase. Journal of Biotechnology, v. 128, pp. 80–85.

THÉVENOT, D. R., TOTH, K., DURST, R. A., WILSON, G. S. (2001) Eletrochemical biosensors: recommended definitions and classifications. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, pp. 121-131.

TIMUR, S., PAZARLIOGLU, N., PILLOTON, R., TELEFONCU, A. (2004) Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix. *Sensors and Actuators B*, v. 97, pp. 132–136.

TOMITA, I. N., MANZOLI, A., YAMANAKA, F., YAMANAKA, H. (2005) Amperometric biosensor for ascorbic acid. *Eclética Química*, v. 30, n. 2, pp. 37-43.

TOPÇU, S., SEZGINTÜRK, M. K., DINÇKAYA, E. (2004) Evaluations of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 20, pp. 592-597.

VALDMAN, E. (2004) Detector de naftaleno por bioluminescência. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

VAN GELDER, C. W., FLURKEY, W. H., WICHERS, H. J. (1997) Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry,* v. 45, n. 7, pp. 1309-1323.

VELASCO-GARCIA, M. N., MOTTRAM, T. (2003) Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystem Bioengineering*, v. 84, pp. 1-12.

VIEIRA, I. C, FATIBELLO-FILHO, O. (2002) Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. *Talanta*, v. 52, pp.681-689.

VIEIRA, I. C., LUPETTI, K. O., FATIBELLO-FILHO, O. (2003) Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*). *Química Nova,* v. 26, n. 1, pp. 39-43.

WASSER, S. P. (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, pp. 258-274.

WICHERS, H. J., GERRITSEN, Y. A. M., CHAPELON, C. G. J. (1996): Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus. Phytochemistry,* v. 43, n. 2, pp. 333-337.

YILDIZ, H. B., CASTILLO, J., GUSCHIN, D. A., TOPPARE, L., SCHUHMANN, W. (2007) Phenol biosensor based on electrochemically controlled integration of tyrosinase in a redox polymer. *Microchim Acta*, v. 159, pp. 27–34.

ZEJLI, H., HIDALGO-HIDALGO DE CISNEROS, J. L., NARANJO-RODRIGUEZ, I., LIU, B., TEMSAMANI, K. R., MARTY, J. L. (2008) Phenol biosensor based on Sonogel-Carbon transducer with tyrosinase alumina sol–gel immobilization. *Analytica Chimica Acta*, v. 612, pp. 198-203.

ZHANG, S., ZHAO, H., JOHN, R. (2001) A dual-phase biosensig system for the determination of phenols in both aqueous and organic media. *Analytica Chimica Acta*, v. 441, pp. 95-105.

ANEXO 1

Fotografia do sistema biossensor montado: eletrodo de oxigênio e tecido fúngico.