UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA – Departamento de Engenharia Bioquímica

DESENVOLVIMENTO PRELIMINAR DE UM BIOSSENSOR ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE TANINOS HIDROLISÁVEIS

ARIANA FARIAS MELO

2008

DESENVOLVIMENTO PRELIMINAR DE UM BIOSSENSOR ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE TANINOS HIDROLISÁVEIS

ARIANA FARIAS MELO

Dissertação apresentada 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 para obtenção do Titulo de Mestre em Ciências.

Orientadores: Andréa Medeiros Salgado
Gustavo Adolfo Saavedra Pinto.

Escola de Química
Universidade Federal do Rio de Janeiro
2008

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE TANINOS HIDROLISÁVEIS

ARIANA FARIAS MELO

Dissertação apresentada 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 – UFRJ como parte dos requisitos necessários à obtenção do Titulo de Mestre em Ciências.

Aprovada por:

Orientador (es)

_____

Andréa Medeiros Salgado, D. Sc

_____

Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, D. Sc

Banca Examinadora

_____

Mônica Caramez Triches Damaso, D.Sc

_____

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc

_____

Sônia Couri, D.Sc

Escola de Química
Universidade Federal do Rio de Janeiro
2008

MELO, Ariana Farias

Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisaveis/ Ariana Farias Melo. Rio de Janeiro: UFRJ / EQ, 2008.
xix, 104f., 29,7 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro/ UFRJ, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2008.

Orientadores: Andréa Medeiros Salgado e Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

1. Biossensor
2. Taninos.
3. Tanase
4. Tecnologia Enzimática
I: Salgado, Andréa Medeiros. Pinto, Gustavo Adolfo Saavedra.
II: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.
III. Título.

Aos meus pais Adriano e Glaucia

e aos meus irmãos

Argos, Arine e Adriana,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente agradeço aos meus pais Adriano e Glaucia, pelo seu apoio e ajuda em todas as horas, pois sem eles, não disso seria possível.
- As minhas irmãs Arine e Adriana, por me fazer lembrar que é sempre bom voltar pra casa.
- Ao meu irmão Argos, que apesar de usar poucas palavras sempre me ajuda na hora de tomar alguma decisão
- A professora Andréa pela sua acolhida e orientação.
- Ao Gustavo, pela sua orientação nos últimos anos e principalmente pela sua amizade, conselhos e ajuda em todos os momentos.
- Aos meus “padrinhos cariocas”, Oldar e Maria Lúcia que adotei de coração.
- A Maria Marta, a “irmã mais velha” que passei a ter.
- Aos amigos Jorge e Adriana pelos deliciosos bolinhos de milhos sempre bem-vindos.
- A Cássia pelos belos passeios.
- A professora Maria Alice por ter me recebido em seu Laboratório.
- Aos meus companheiros e amigos de Laboratório, pela convivência e boas horas de risadas: Rafael, Diego, Ana Iraidy, Etel, André, Priscilla (e Sophia), Lívia, Ana Claudia, Bernardo, Nattascha, Mariana, Kelly, Ana Paula;
- A companheira Roberta pelas nossas longas caminhas e pelos cafezinhos.
- A Gizele por sua amizade e companheirismo deste o inicio.
- A Tatiana pela acolhida em sua família e principalmente por me fazer lembrar que sempre podemos conquistar novas amizades eternas e sem cobranças.
- A Luiza por sempre me ajudar a lavam os inúmeros tubos de ensaio.

- A todos os meus grandes amigos cearenses que apesar da distância sempre estiveram presentes: Germana, Emanuela,Rebeca, Esau, Ivan, Valter, Fernanda, Kênya, Milena e Rodrigo.
- A CAPES pelo suporte financeiro.

Enfim agradeço a todos que a seu modo me ajudaram a conquistar mais uma etapa na minha vida.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO PRELIMINAR DE UM BIOSSENSOR ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE TANINOS HIDROLISAVEIS

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Ariana Farias Melo

Orientadores: Andréa Medeiros Salgado, D. Sc

Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, D. Sc

O uso de enzimas para fins analíticos vem aumentando a cada dia, principalmente no ramo da biotecnologia ligada ao desenvolvimento de novos instrumentos de análises cada vez mais específicos. Desta forma, o desenvolvimento de biossensores vem crescendo, já que estes permitem que a medida do analito de interesse seja realizada pela transdução seletiva de um parâmetro da reação biocomponente-analito em um sinal elétrico passível de ser monitorado. Por este motivo, o elemento biológico que compõe o instrumento, torna-se um componente essencial para a sua construção. Com isso o objetivo deste trabalho foi o estudo de um processo de imobilização da enzima tanase em suporte vítreo, a determinação das suas condições ótimas de atuação e a sua eficiência quando aplicada a um sistema adequado de transdução para a construção de um biossensor para taninos hidrolisáveis. Após o processo de imobilização o pH ótimo

da tanase imobilizada, apresentou um pequeno desvio para o lado alcalino, já temperatura ótima se manteve igual ao da tanase na forma solúvel. A tanase imobilizada demonstrou um comportamento linear da sua atividade na faixa de concentração de 100 a 500mg/L de acido tânico, iniciando a partir daí uma diminuição na taxa de reação até uma concentração de 1000mg/L de acido tânico, para ambas as temperaturas avaliadas (30°C e 50°C), sendo que os valores de $V_{máx}$ e K_m foram maiores na temperatura de 50°C. Verificou-se também que a tanase imobilizada apresenta um ótimo perfil de estabilidade sob as condições de reação de pH 5,0 e 30°C.Um outro ponto analisado foi o tempo de vida útil, demonstrando que a tanase imobilizada após um período de 90 dias de estocagem reteve a sua atividade . No aspecto de reutilização do suporte foi possível verificar que é possível realizar a reutilização do suporte o que torna a fabricação dos biossensor economicamente mais viável Com relação aos testes para o possível transdutor a ser utilizado a enzima tanase imobilizada demonstrou ser apta a ser utilizada no desenvolvimento do biossensor enzimático, quando foi utilizado o sistema de transdução tanase imobilizada e colorímetro (490 nm), uma vez que o sistema apresentou uma boa repetibilidade e linearidades em suas respostas.

ABSTRACT

DEVELOPEMENT AN ENZIMATIC BIOSENSOR FOR TANNIN DETERMINATION

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Ariana Farias Melo

Orientadores: Andréa Medeiros Salgado, D. Sc

Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, D. Sc

The use of enzymes for analytical purposes is increasing every day, mainly in the field of biotechnology related to the development of new tools for analysis increasingly specific. Thus, the development of biosensors is growing, it allows the measurement of the analyte of interest is achieved by transduction of a selective parameter of the reaction biocomponente-analyte in an electric signal that can be monitored. For this reason, the biological factor that makes up the instrument, it is an essential component for its construction. With that the aim of this work was the study of a process of immobilization of the enzyme tannase in support vitreous, the determination of their conditions of work and their optimal efficiency when applied to a proper system of transduction for the construction of a biosensor for hydrolysable tannins. After the process of immobilization the optimum pH of tannase immobilized, presented a small diversion to the alkaline side, as optimum temperature remained the same as in the tannase as soluble The tannase immobilized showed a linear behavior of its activity in

the concentration range of 100 to 500mg / L of tannic acid, starting from there a decrease in the rate of reaction until a concentration of 1000 mg/L of tannic acid for both temperatures evaluated (30°C and 50°C), and the values of Km Vmáx and were higher in temperature of 50°C. There was also that the tannase immobilized presents a great profile of stability under the conditions of reaction at pH 5.0 and 30°C. An another point considered was the time of life, demonstrating that the tannase immobilized after a period of 90 days, stocking retained their activity. In the aspect of re-use of the media were unable to verify that it is possible to reuse the support which makes the manufacture of biosensor most economically viable With regard to testing for the transducer can be used to tannase immobilized enzyme shown to be able to be used in development the enzyme biosensor, when the system was used for transduction tannase immobilized and colorimeter (490 nm), as the system showed good repeatability and linearidades in their answers.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO 01

CAPÍTULO 2 – OBJETIVO 06

CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRAFICA 08

3.1 - Taninos 08

3.1.1. – Taninos Hidrolisáveis 10

3.1.2 – Taninos Condensados - Proantocianidinas 13

3.1.3 – Taninos na Indústria 15

3.1.4 – Métodos de Quantificação de Taninos 16

3.2 – Biossensores 17

3.2.1 – Funcionamento de um biossensor 19

3.2.2 – Componente biológico 21

3.2.3 – Transdutor 24

3.2.4 – Aplicação dos biossensores 31

3.3 – Enzimas 32

3.3.1. – Atividade enzimática 34

3.3.2 – Tanase 35

3.3.2.1 – Ação da enzima tanase 36

3.3.2.2 – Fonte de obtenção da enzima tanase 38

3.3.2.3 – Propriedades da enzima tanase 39

3.4 – Imobilização do componente biológico 41

3.4.1 – Imobilização por adsorção 43

3.4.2 – Imobilização por Oclusão 44

3.4.3 - Imobilização por Encapsulação 45

3.4.4 – Imobilização por Ligação Covalente Cruzada 45

3.4.5 – Imobilização por Ligação Covalente 46

3.4.6 - Influência do Glutaraldeido 47

CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS 50

4.1 – Materiais e Reagentes 50

4.1.1 - Enzima 50

4.1.2 – Suporte 50

4.1.3 - Reagentes 51

4.2 - Metodologias 51

4.2.1 – Determinação da atividade da tanase livre 51

4.2.1 – Técnica de imobilização 53

4.2.2 – Determinação de atividade da tanase imobilizada 54

4.2.3 – Determinação do efeito da imobilização sobre o perfil de atividade da enzima. 57

4.2.3.1 - pH 57

4.2.3.2 –Temperatura 58

4.2.4 – Determinação do efeito de fatores externos e operacionais sobre a estabilidade da enzima imobilizada. 58

4.2.4.1 - pH 58

4.2.4.2 – Temperatura 59

4.2.4.3 – Operacional 59

4.2.5 – Avaliação da influência da imobilização sobre os parâmetros cinéticos da enzima. 60

4.2.5.1 – Determinação da taxa de reação (vo) 60

4.2.5.2 – Determinação de Vmax e Km 60

4.2.6 – Avaliação do tempo de vida útil da enzima imobilizada 61

4.2.7 – Avaliação da reutilização do suporte 61

4.2.8 – Determinação da variação de pH pela ação da enzima tanase livre e imobilizada. 62

4.2.9 – Determinação da variação colorimetrica pela ação da enzima tanase imobilizada. 62

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES 64

5.1 – Imobilização do componente biológico (enzima tanase) e avaliação da técnica utilizada sob diferentes aspectos 64

5.1.1- Avaliação do Procedimento de Imobilização 66

5.1.2 – Avaliação do Tempo no Processo de Imobilização 67

5.1.3-Efeito do pH na Atividade da Enzima Tanase Livre e Imobilizada 69

5.1.3.1-Influência do pH no perfil de atividade da enzima tanase 69

5.1.3.2- Estabilidade da enzima tanase sob diferentes valores de pH 71

5.1.4- Efeito da Temperatura na Atividade da Enzima Tanase Livre e Imobilizada 72

5.1.4.1- Influência da temperatura no perfil da atividade da tanase 73

5.1.4.2- Estabilidade térmica da enzima tanase 75

5.1.5- Determinação dos Parâmetros Cinéticos da Tanase Imobilizada 76

5.1.6- Determinação do Tempo de Vida útil da Tanase imobilizada 79

5.1.7- Determinação da Estabilidade Operacional da Tanase Imobilizada 81

5.1.8- Estudos de Reutilização do Suporte para o Processo de Imobilização 83

5.2- Testes com transdutores 85

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 - Conclusões 95

6.2 - Sugestões 97

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 98

Lista de Tabelas

Tabela	Descrição	Pág.
3.1	Tipos de transdutores empregados em biossensores	25
5.1	Atividade da tanase imobilizada no suporte avaliado	67
5.2	Efeito do tempo do processo de imobilização na atividade da enzima tanase imobilizada	68
5.3	Parâmetros cinéticos da tanase livre e imobilizada	78
5.4	Rendimento da imobilização e determinação das atividades com a reutilização do suporte	84
5.5	Equação da reta das curvas obtidas pelo sistema colorímetro + tanase imobilizada	94

Lista de Figuras

Figura	Descrição	Pág.
3.1	Reação de oxidação do anel aromático de unidades de ácido gálico	11
3.2	Reação oxidativa de formação de um tanino hidrolisável.	12
3.3	Divisão dos taninos hidrolisáveis	13
3.4	Taninos condensados	14
3.5	Esquema geral de funcionamento de um biossensor	20
3.6	Classificação dos biossensores de acordo com o Elemento Biológico Sensível	22
3.7	Atividade esterásica e depsidase da Tanase.	37
3.8	Etapas da degradação do ácido tânico pela Tanase.	38
3.9	Classificação dos métodos de imobilização de enzimas.	43
3.10	Grupamento funcionais presentes nas enzimas.	46
3.11	Formas propostas para o glutalradeido – aquosa, (I) liner-mono (II) e dihidratos (III), um hemiacetal cíclico (IV) e oligômeros (V).	48
3.12	Estrutura do glutaralteido em solução acida e neutra.	48

4.1	Fotográfica do suporte utilizado – Pérola de vidro	51
4.2	Formação do complexo: Ácido Gálico com a Rodanina.	52
4.3	Descrição química da reação no processo de imobilizaç.	53
5.1	Atividade residual de tanase no sobrenadante ao longo do processo de imobilização	66
5.2	Perfil da atividade residual da tanase livre (♦) e imobilizada em pérolas de vidro (■) a diferentes valores de pH	69
5.3	Estabilidade da tanase livre e imobilizada em pérola de vidro sob diferentes valores de pH .	72
5.4	Perfil da atividade residual da tanase livre (♦) e imobilizada (■) a diferentes valores de temperatura	73
5.5	Estabilidade térmica da tanase livre e imobilizada e imobilizada.	75
5.6	Atividade da tanase imobilizada em função da concentração de ácido tânico nas temperaturas de reação de 30ºC (♦) e 50ºC (■)	77
5.7	Avaliação dp tempo de vida útil da tanase livre e imobilizada em pérolas de vidro	80
5.8	Estabilidade operacional da tanase imobilizada em pérolas de vidro a 30ºC (a) e 50ºC (b).	82

5.9	Curva de resposta para o transdutor (eletrodo de pH) a partir de reações da enzima tanase livre	86
5.10	Avaliação da estabilidade de resposta do eletrodo com o tempo de reação (♦) 5 min (■) 10 min (▲) 15 min.	87
5.11	Curva de resposta ou calibração para o sistema transdutor (eletrodo de pH) e a enzima imobilizada usando soluções de diferentes concentrações de ácido tânico com e sem lavagem entre as medidas	89
5.12	Avaliação do tempo de reação na resposta do sistema eletrodo de pH + enzima tanase imobilizada em pérolas de vidro (a) 5 minutos, (b) 10 minutos (c) 15 minutos.	91
5.13	Curva de resposta ou calibração para o sistema transdutor (colorímetro) + enzima tanase imobilizada usando soluções de diferentes concentrações de ácido tânico com e sem lavagem entre as medidas.	93

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A necessidade de sistemas de detecção mais versáteis para o monitoramento de bioprocessos tem estimulado a produção de uma grande variedade de métodos analíticos. Os biossensores revelam grandes perspectivas quanto a sua utilização no monitoramento “on-line” de biorreatores, possibilitando uma rápida adaptação nos processos biotecnológicos (Alfaya, 2002). A incorporação de moléculas com atividade biológicas, principalmente enzimas, em metodologias analíticas tem aumentado sensivelmente nos últimos anos, obtendo sucesso nos mais variados procedimentos ,inclusive nos que visam à área de controle dos bioprocessos (Alfaya, 2002, Salgado, 2001).

Os biossensores são ferramentas analíticas que combinam biomoléculas imobilizadas com transdutores químicos ou físicos para criar uma superfície que permita a medição direta, possivelmente contínua, de um analito específico. Assim, um biossensor combina a especificidade de um componente biológico ativo, para o analito de interesse, com a sensibilidade de um transdutor, que converte o sinal biológico em um sinal elétrico proporcional à concentração do analito (Salgado, 2001). Os biossensores representam uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas existentes, devido as suas características únicas, tais como seletividade, baixo custo relativo de construção e estocagem, potencial para miniaturização,

facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para rápidas análises de monitoramento no campo. Entretanto, é necessário enfatizar que estas ferramentas não podem e não devem ser vistas como uma substituição das técnicas analíticas clássicas, mas sim como um complemento a estas (Cabral *et al*, 2003; Romani *et al.,* 2000)

A possibilidade de minimizar ou até mesmo eliminar alguns fatores limitantes apresentados pelas enzimas livres, como solubilidade em água, baixa ou nenhuma resistência a temperaturas elevadas, não poderem ser utilizadas em solventes orgânicos e estarem presente em baixas concentrações (Chibata e Tosa, 1978), faz com que as enzimas imobilizadas tornem-se bastante atrativas para serem utilizadas no desenvolvimento de novos métodos analíticos. Através da imobilização é possível obter uma maior estabilidade da enzima, uma menor interferência de compostos indesejáveis e também a possibilidade de reutilizar a mesma diminuindo assim o custo por análise (Zhao *et al*., 1998, Campanella *et al*., 2008 Cabral *et al*, 2003). O processo de imobilização do componente biológico também é uma etapa crucial na construção de um biossensor, pois a escolha da técnica de imobilização, bem como, do suporte a ser utilizado é de extrema importância para o bom desempenho deste instrumento (Arya, *et al*., 2008)

Em contrapartida, o suporte a ser utilizado pode ter um efeito crítico sobre a eficiência do processo de imobilização e da estabilidade da enzima (Tischer e Kasche, 1999). Entres os suportes mais utilizados podemos citar os suportes orgânicos e os inorgânicos. Os suportes orgânicos podem ser sintéticos como o nylon entre outros ou naturais (quitina, celulose, etc.), já os inorgânicos poder ser

divididos em de origem mineral (argilas e areia) ou de origem sintética (vidro e sílica).

Os suportes inorgânicos apresentam uma série de vantagens, tais como: elevada força mecânica, estabilidade térmica e resistência ao ataque de microrganismos e de solventes orgânicos (Hernández-Jústiz *et al*., 1998). Além disso, os materiais inorgânicos não apresentam modificação na sua estrutura quando expostos a uma ampla faixa de valores de pressão, temperatura e pH.

Os taninos são compostos fenólicos com alto peso molecular que apresentam a propriedade de se combinar com proteínas, formando complexos (Leka e Lonsane. 1997). Podem estar presentes em folhas, frutas, cascas, podendo se acumular em grandes quantidades em tecidos vegetais específicos (Pinto *et al*. 2005). Os complexos formados com as proteínas são de especial interesse para as indústrias de curtimento e de bebidas. Nesta última, causam grandes problemas nos processos industriais, como por exemplo na produção de chás gelados formando uma espécie de “creme” (Makkar, 1998; Santos *et al*. 1997).

Os taninos representam o segundo maior grupo entre os compostos fenólicos e o quarto constituinte mais abundante nos vegetais (Haslam 2007 e Pinto *et al*. 2005). São divididos em dois grupos com base na sua estrutura molecular: os taninos hidrolisáveis e as proantocianidinas (Aguilar e Guitiérrez-Sánchez 2001). Os taninos hidrolisáveis são constituídos por poliésteres de ácido gálico e diferentes carboidratos. A molécula com um poliol, em geral a glicose, compõe o núcleo central, cujos radicais hidroxil podem estar parcialmente ou totalmente esterificados com radicais galoil. Esses taninos são hidrolisáveis por ácidos, bases e enzimas em suas unidades formadoras, sendo divididos em galotaninos e elagitaninos. As

proantocianidinas também chamadas de taninos condensados por causa da sua estrutura química compacta. São constituídas por oligômeros ou polímeros de unidades flavonóides unidas por ligações carbono-carbono não suscetíveis à clivagem por hidrólise.

Existem atualmente na literatura, vários métodos para determinação de taninos hidrolisáveis, entretanto cada um apresenta restrições de aplicação, principalmente no que se diz respeito a sua aplicação em amostras reais. Inoue e Hagerman (1988) desenvolveu um procedimento para determinação de taninos hidrolisáveis, que envolve a formação de complexo com a rodanina, porém esse método só é eficiente para os galotaninos. Wilson e Hagerman (1990) relataram um aperfeiçoamento da metodologia que utiliza $NaNO_2$ como reagente, mas esse método é eficiente apenas para a quantificação de acido elágico, ácido formado pela hidrólise dos elagitaninos. Já Bate – Smith (1977) descreve um método para determinação tanto de galotaninos como de elagitaninos, contudo esse método apresenta dois pontos críticos, temperatura e tempo de reação, já que em temperaturas elevadas aceleram a reação e o complexo formado só é estável em um curto espaço de tempo. Zhao *et al.,* (1998) desenvolveram um sensor microbiano para determinação de ácido tânico (tipos mais comum utilizado como padrão para quantificação de tanino), baseando-se na variação de oxigênio gerada pela degradação do composto orgânico (ácido tânico) pelo microrganismo. Comparando a proposta do sensor para ácido tânico com outros biossensores este representa uma nova abordagem conveniente e de baixo custo para a quantificação dos taninos vegetais, porém são necessárias algumas melhorias para torná-lo amplamente aceito na indústria de curtumes de produtos alimentícios e farmacêutica.

Neste trabalho foi estudado o processo de imobilização da enzima tanase em suporte vítreo (pérola de vidro), bem como as características bioquímicas (pH e temperatura ótima, estabilidade térmica, alcalina e operacional) e as cinéticas da tanase imobilizada em pérolas de vidro. Suas características foram avaliadas visando alcançar a melhor condição de atuação para utilização no desenvolvimento de um biossensor enzimático para que este possa ser aplicado no futuro na monitoração de taninos hidrolisáveis.

CAPÍTULO 2

OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho foi alcançar o desenvolvimento preliminar de um Biossensor Enzimático, capaz de quantificar a concentração de taninos hidrolisáveis, para que futuramente, este possa ser integrado a um biorreator para monitorar continuamente de forma adequada a concentração de taninos.

Para o desenvolvimento preliminar do biossensor para taninos foram realizadas várias etapas iniciais, que estão descritas a seguir:

- Seleção mediante pesquisa bibliográfica do componente biológico a ser utilizado, baseado na sua reação biológica.
- Imobilização do componente biológico e estudo da eficiência da imobilização, usando suporte inorgânicos, pérolas de vidro.
- Avaliação do tempo de vida útil do componente imobilizado
- Estudo comparativo da eficiência do método de imobilização e avaliação do reuso do suporte.
- Avaliação das melhores condições de atuação do componente biológico imobilizado (pH, temperatura, etc.).

- Determinação da faixa de concentração do substrato a ser medida através também da determinação da atividade do componente biológico.

- Teste da estabilidade da enzima tanase imobilizada sob condições de estocagem.

- Seleção do transdutor apropriado para medição, baseado nos produtos das reações biológicas e realização de testes preliminares usando o transdutor mais adequado.

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - TANINOS

Nos vegetais encontramos quantidades relativamente importantes de compostos fenólicos. Seu papel é essencialmente proteger os tecidos contra o ataque de insetos, fungos ou de bactérias (Haslam, 2007; Pinto *et al.*,2005; Lekha e Lonsane, 1997), sendo considerado um sistema de defesa passiva relativamente eficaz. As plantas podem igualmente produzir grandes quantidades de fenóis a partir de uma alteração na superfície das células vivas: é a defesa ativa. O melhor exemplo é dado pela picada dos insetos nas folhas que são a origem da formação das galhas (Haslam 2007).

O termo tanino possui diferentes definições, Lekha e Lonsane (1997) definem taninos como sendo, compostos fenólicos com alto peso molecular (500 a 3000 Kda.) que possuem a propriedade de combinar-se com proteínas, celulose e pectina formando um complexo insolúvel. Já Bate-Smith definem taninos como compostos fenólicos solúveis em água, com peso molecular entre 500 e 3000 u.m.a e habilidade para precipitar proteína. Mais especificamente os taninos são compostos de alto peso molecular, que contêm suficientes grupamentos hidroxila fenólica, para

permitir a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas (Mueller-Harvey, 2001).

Na forma não oxidada os taninos reagem com as proteínas através de pontes de hidrogênio e/ou ligações hidrofóbicas. Quando oxidados os taninos se transformam em quinonas, as quais formam ligações covalentes com alguns grupos funcionais das proteínas, principalmente os grupos sulfidrilos da cisteína e amino da lisina (Sgarbieri, 1996).

Esta classe de compostos fenólicos é o quarto mais abundante constituinte vegetal, depois da celulose, hemicelulose e lignina (Haslam, 2007). Atuam como parte do mecanismo de defesa dos vegetais contra microrganismos, herbívoros e condições ambientais hostis. As plantas que contém altos níveis de taninos apresentam vantagem evolucionárias significativas sobre seus predadores e outras espécies vegetais, que competem pelo mesmo nicho. Altas quantidades de taninos estão associadas com a resistência de vegetais ao ataque microbiano (Aerts *et al.*,1999; Pansera *et al.*, 2003).

Os taninos são compostos presentes em alimentos e bebidas, principalmente na cerveja, chá e vinho (Pansera *et al.*, 2003). Esses componentes são muito importantes na indústria de alimentos, principalmente pelas influências que apresentam sobre suas características físico-químicas, por formarem precipitados com proteínas e alguns sais e estarem sensorialmente ligados a adstringência de certos frutos, além de apresentarem ação antioxidante.

A propriedade que os taninos possuem de causar adstringência está envolvida diretamente com a sua capacidade de interagir com proteínas, gerando principalmente uma interação covalente (Poncet-Legrand *et al.* 2006). A

adstringência é a percepção sensorial da presença de taninos, sendo que tal percepção na boca não ocorre de forma imediata, requer um determinado tempo para se desenvolver (Bate-Smith, 1954)

A perda da adstringência é a principal mudança que ocorre durante o amadurecimento das frutas comestíveis. Tal fato pode estar associado, ou não, á redução do conteúdo de taninos. Frutas como caqui (*Diospuros Kako*) e o cajú (*Anacarduim occidentale*), por vezes são adstringentes mesmo quando maduros (Haslam e Lilley, 1988; Pinto, 2003)

Uma classificação baseada nos tipos estruturais,divide os taninos em hidrolisáveis e condensados.

3.1.1 – TANINOS HIDROLISÁVEIS

São poliésteres de acido gálico e diferentes carboidratos que podem ser hidrolisados por ácidos, bases ou enzimas (por exemplo a tanase) á açúcares ou alcoóis e ácidos carboxílicos fenólicos. A molécula com um poliol, em geral glicose, compõe o núcleo central, cujos radicais hidroxil podem estar parcialmente ou totalmente esterificado com radical galoil. Para serem considerados taninos é necessário que pelo menos 3 grupamentos hidroxil da molécula de glicose estejam esterificados para exibir a capacidade de se ligar e precipitar proteínas (Mueller-Harvey, 2001; Aguilar e Guitiérrez-Sánchez 2001).

Existe na natureza uma grande número de moléculas de taninos hidrolisáveis. A variação de estruturas entre estes componentes é causada por reações oxidativas de unidades de ácidos gálico vizinhos ou por oxidação do anel aromático. A Figura

3.1 mostra um exemplo desses dois tipos de reações. As reações de acoplamento oxidativo podem produzir taninos hidrolisáveis longos e complexos (Mueller-Harvey, 2001).

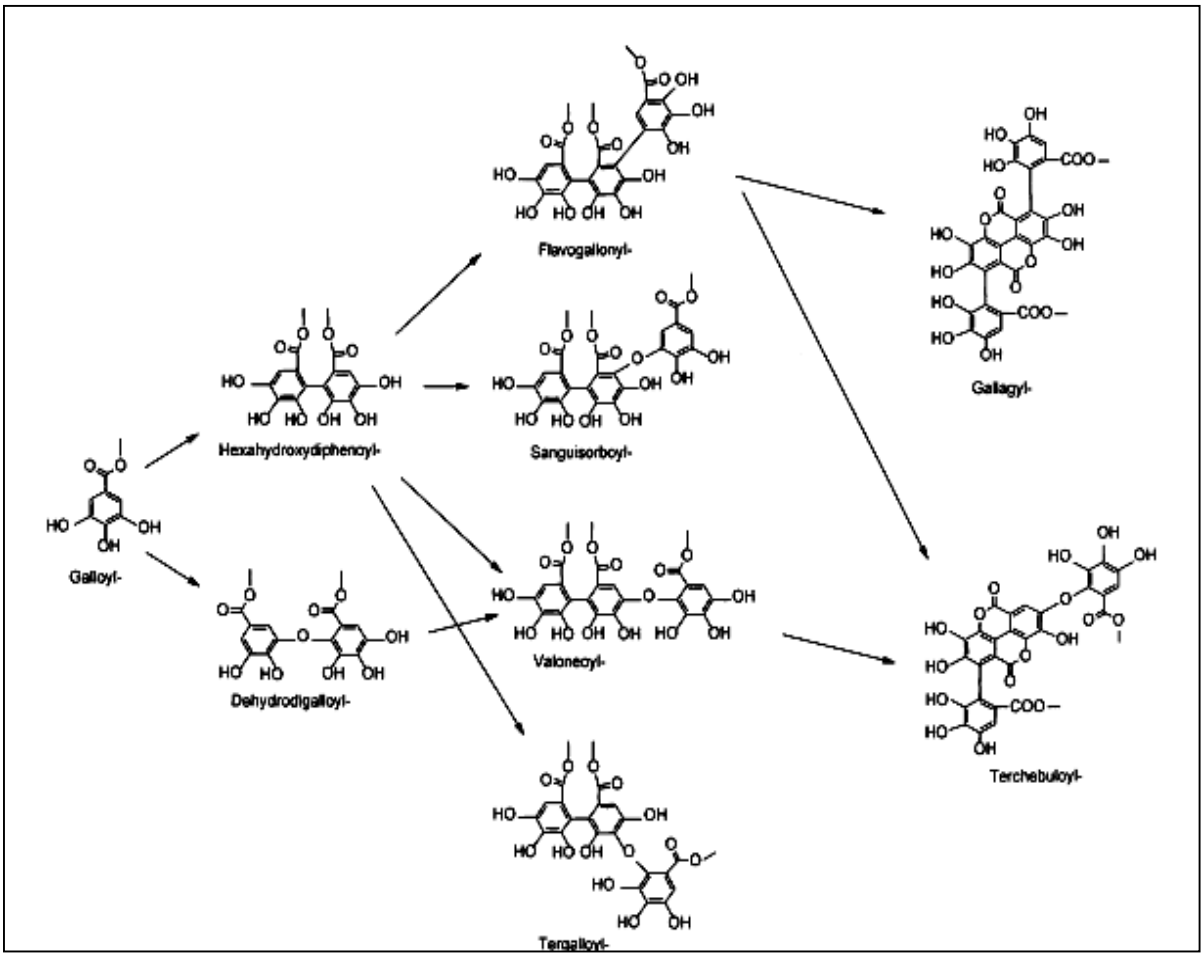


Figura 3.1: Reação de oxidação do anel aromático de unidades de ácido gálico (Mueller-Harvey, 2001).

A Figura 3.2 mostra a estrutura química de um tanino hidrolisável formado pela união oxidativa entre duas moléculas de ácidos gálico, cada qual unida por diferente anéis de glicose. Cabe ressaltar que a maioria das determinações colorimétricas dos taninos hidrolisáveis detecta somente o grupo galoil, mas não os produtos mais complexos da reação descritos nas Figuras 3.1 e 3.2.

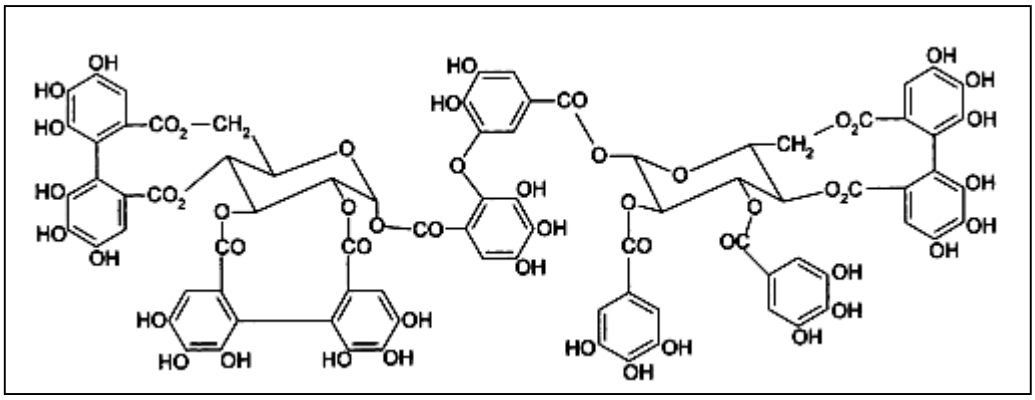


Figura 3.2: Reação oxidativa de formação de um tanino hidrolisável (Mueller-Harvey, 2001)

Os taninos hidrolisáveis de acordo com a sua estrutura, podem ser divididos em duas sub-classes : galotaninos e elagitaninos (Figura 3.3). Nos galotaninos, os grupos fenólicos que esterificam o núcleo glicosídico são constituídos pelo acido gálico, ou pelo ácido digálico, estando as duas unidades galoil unidas por ligações depsídicas. Nos elagitaninos, os grupos fenólicos utilizados são moléculas de ácido hexahidroxidifênico que podem se desidratar espontâneamente para formar sua dilactona estável, o ácido elágico.

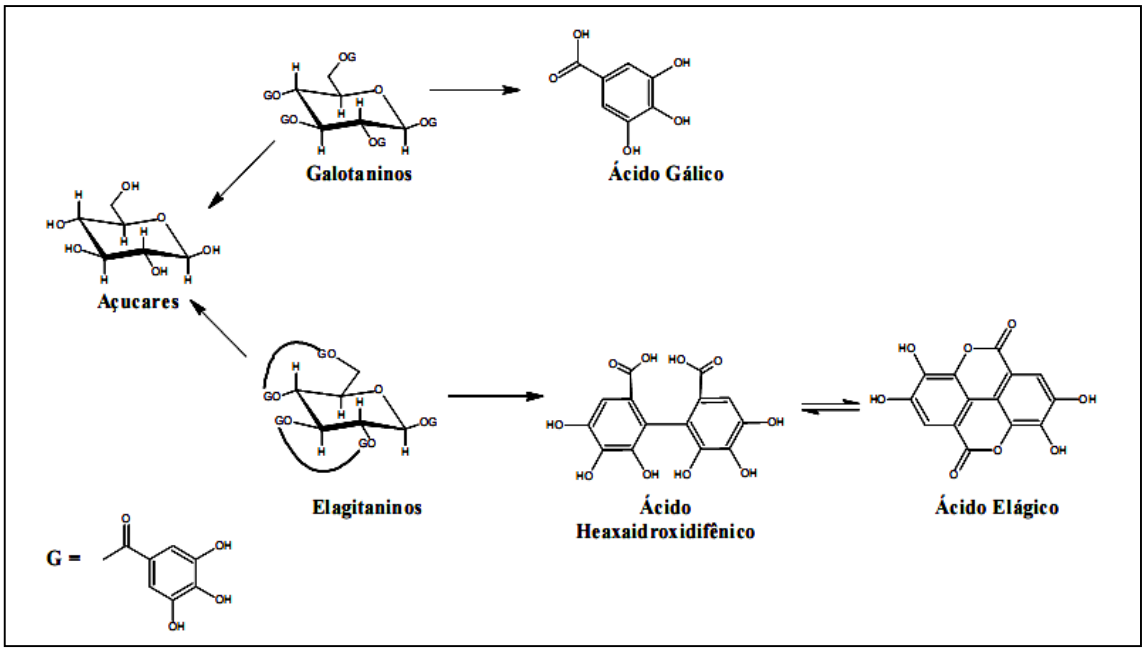


Figura 3.3: Divisão dos taninos hidrolisáveis (Mueller-Harvey, 2001).

3.1.2 – TANINOS CONDENSADOS – PROANTOCIANIDINAS

Proantocianidinas também conhecidas como taninos condensadas, são oligômeros ou polímeros de unidades flavonóides unidas por ligações carbono-carbono, não suscetíveis à clivagem por hidrólise (Figura 3.4). O tamanho das moléculas pode ser descrito pelo seu grau de polimerização. Ao contrário dos taninos hidrolisáveis, proantocianidinas não contém resíduos de carboidratos. Contém de 2 a 50 ou mais unidades flavonóides, podendo atingir massas moleculares superiores a 20 KDa (Lekha e Lonsane, 1997).

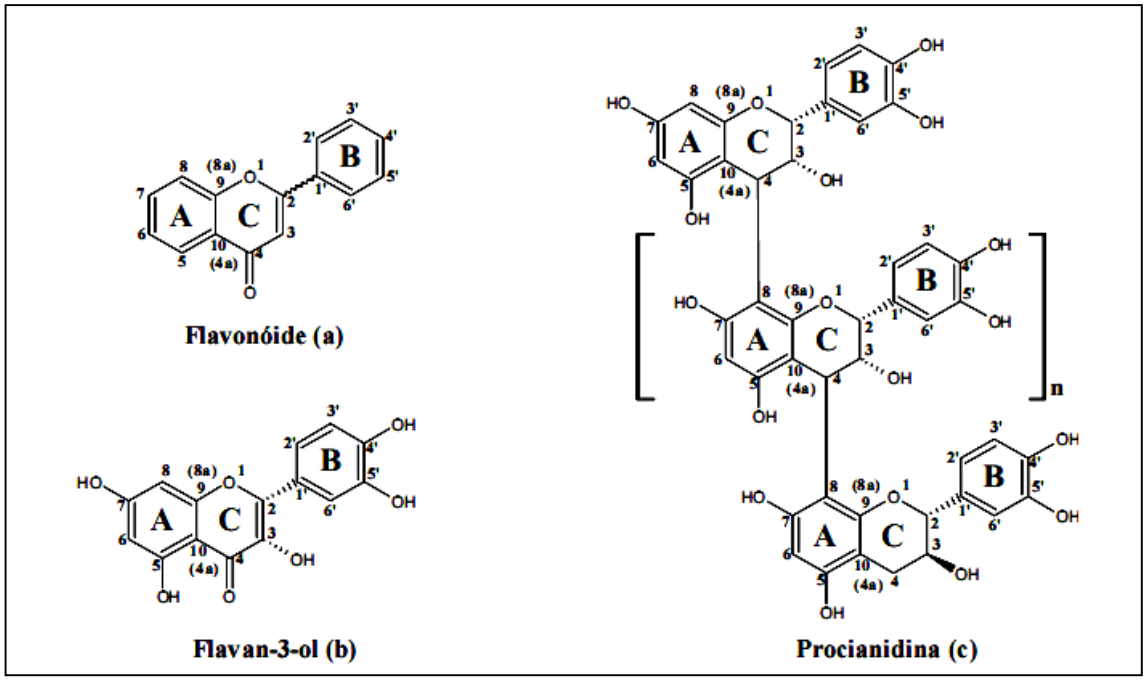


Figura 3.4: Taninos condensados (Mueller-Harvey, 2001)

Proantocianidinas são de grande interesse na medicina e na nutrição pela sua potente capacidade de agir como antioxidante e possíveis efeitos sobre a proteção da saúde humana. Recentemente foi relatada a hipótese de que as proantocianidinas podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares, câncer e coagulação sanguínea, além de que, alguns de tipos podem auxiliar no trato urinário. Estudos anteriores constataram que houve uma relação direta entre atividade antioxidante destes compostos fenólicos totais presentes em ervas, legumes e frutas selecionadas (Barahona *et al.*, 2006, Ferwerda *et al.*, 2006).

As proantocianidinas apresentam uma diversidade estrutural devido ao grande número de grupos hidroxilas presente em cada unidade, à estereoquímica dos três centros quirais do anel B (Figura 3.4), à localização das ligações interflavanas e em menor proporção, as possíveis derivatizações como O-metilalação ou de O-glicosilações. Em razão de suas estruturas químicas, sem a

presença de ligações éster e depsídica, as proantocianidinas não são suscetíveis a hidrólise pela enzima tanase. (Barahona *et al.*, 2006; Aguilar e Guitiérrez-Sánchez 2001, Pinto *et al*,2005).

3.1.3 – TANINOS NA INDÚSTRIA

Os taninos industriais são extraídos a partir de um grande número de espécies vegetais e são encontrados nas partes lignificadas, nos frutos e nas protuberâncias de origem patógena apresentadas como forma de marcas ou cicatrizes em frutos e nas folhas. Seu campo de utilização compreende as indústrias agro-alimentares, farmacológicas e de curtimento de couros.

Na indústria alimentícia os taninos são usados como antioxidante em sucos de frutas e bebidas, como corantes têxteis na produção de borrachas e como coagulantes e floculantes na tratamento de água em barragens (Santos e Melo, 1999). Também podem ser aplicados no curtimento do couro, em função da sua capacidade de se combinar com proteínas da pele animal, ou seja, na associação dos polifenois com a proteína do colágeno que irá inibir o processo de putrefação da pele (Khandnbabaee e Ree, 2001). Também são considerados potentes inibidores de enzimas devido a sua complexação com proteínas enzimáticas (Naczk et al., 1994).

Os taninos condensados estão presentes na fração da fibra alimentar de diferentes alimentos e podem ser considerados indigeríveis ou pobremente digeríveis. Em leguminosas e cereais os taninos têm recebido considerável atenção, devido aos seus efeitos adversos na cor, sabor e qualidade nutricional (Salunkhe *et al*., 1982).

3.1.4 – MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS

Bate- Smith (1977) descreveram um procedimento para determinação de taninos hidrolisáveis em plantas da espécie *Aces*, na qual produz uma cor rosa após a reação com KIO_3. Hagerman *et al*. (1997) notou que esta análise não seria compatível com misturas complexas de taninos, já que estes tentem a adquirir uma coloração marrom frente a cor rosa. Além disso, esta análise não é considerada confiável pois o desenvolvimento da cor é criticamente dependente da temperatura e do tempo de reação. Willis e Alen (1998) re-examinaram tal metodologia de análise em detalhes e sugeriram um aperfeiçomento do protocolo para determinação de galotanino e elagitanino.

Inoue e Hagerman (1988) relataram um método para determinação de galotaninos, que envolve a formação de um complexo entre rodanina e o ácido gálico, liberado após uma etapa de hidrólise ácida do tanino. O complexo, que possui absorbância máxima a 520 nm, resulta da reação da rodanina com os grupos hidroxil vicinais do ácido gálico. As moléculas de rodanina que não reagiram, não apresentam em solução básica absorbâncias em comprimentos de onda superiores a 450 nm. A rodanina apresenta baixa ou nenhuma afinidade pelos grupos hidroxil de radicais galoil presentes na estrutura dos taninos e também pode reagir, em soluções alcalinas, com quinonas ou hidroquinonas, sendo que os produtos destas reações absorvem em comprimentos de onda maiores (Thies e Fischer, 1973). Desta forma, este método é muito útil para análises rotineiras, pois apresenta alta especificidade (sem interferência dos compostos vegetais fenólicos), sensibilidade e precisão.

Wilson e Hagerman (1990) relataram um aperfeiçoamento da análise com o reagente $NaNO_2$ que foi primeiramente descrido por Bate-Smith para determinação de elagitaninos. Com as modificações feitas por Wilson e Hagerman (1990) a análise tornou-se seletiva somente para determinação do ácido elágico de forma que o ácido gálico, galotaninos, elagitaninos, taninos condensados e flavonóides não iram mais interferir na quantificação.

A carência de métodos analíticos práticos, rápidos e seguros para a quantificação de taninos e ainda metodologias que sejam capazes de discriminá-los torna necessária a busca por técnicas ou instrumentos de medidas alternativas e mais eficientes como por exemplos os chamados biossensores.

3.2 – BIOSSENSORES

O uso de enzimas para fins analíticos vem crescendo a cada dia, desde a década de 60 quando Clark e Lyons (1962) tiveram a idéia de usar uma enzima aliada a um eletrodo para determinação de glicose para controle de diabetes. Neste caso um sensor foi desenvolvido baseado na oxidação de glicose a ácido glicônico, envolvendo consumo de oxigênio e formação de peróxido de hidrogênio por ação da enzima glicose oxidase, de forma que o oxigênio ou peróxido consumido poderiam ser detectados.

Posteriormente os dispositivos criados a partir da junção de uma enzima com um eletrodo receberam o nome de “Eletrodos Enzimáticos”. Contudo, com o desenvolvimento intensivo na busca de novos sensores físico-químicos, em

especial, utilizando-se reações enzimáticas variadas, foi introduzido um termo mais genérico e abrangente, o de “Biossensor” (Alfaya *et.al*, 2002; Rosatto, 2000).

A ciência dos biossensores é uma área multidisciplinar para a qual não existe forma delineada. A rápida proliferação dos biossensores e sua diversidade podem justificar as várias formas de definição de um biossensor que se encontram na literatura, mas de forma geral trata-se de uma ferramenta analítica que combinam biomoléculas imobilizadas com transdutores químicos ou físicos para criar uma superfície que permita a medição direta, possivelmente contínua, de um analito específico. 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 elétrico proporcional à concentração do analito (Salgado, 2001). Um biossensor deve ser claramente diferenciado de um sistema bioanalitico que requer etapas adicionais de processamento, tais como, adição de reagentes e o componente biológico não esta necessariamente ligado diretamente ao detector.

Os biossensores fornecem informações analíticas quantitativas usando um elemento biológico reconhecedor incorporado a um transdutor que deve ser capaz de converter a resposta química em um sinal apropriado. O elemento chave do biossensor é a camada sensora, constituída por biomoléculas, que permite avaliar a concentração de componente desejado contido na amostra. A escolha do material biológico e do transdutor adequado depende de cada amostra e do tipo de medida em que se tem interesse. O biocomponente determina o grau de seletividade ou especificidade do biossensor. O reconhecimento seletivo é a principal característica da tecnologia dos biossensores. Diferentes materiais e transdutores tem sido

empregados na construção dos biossensores sendo os eletroquímicos os mais populares, pois apresentam resposta rápida, possuem a vantagem de serem econômicos e a possibilidade de automação, permitindo sua aplicação em um grande número de amostras (Mello *et.al*, 2007; Perez, 2000).

O desenvolvimento dos biossensores em particular é definido pelas exigências regulatórias e natureza da aplicação destes e alguns fatores desempenham um papel decisivo na arquitetura do sensor como sensibilidade, meio ambiente de amostra, custo, tempo de vida útil e uso especifico. Além disso, para ser usado como instrumento de análise o biossensor deve apresentar as seguintes características: seletividade, exemplificada pela especificidade das enzimas; faixa de sensibilidade; acurácia e precisão; tempo de resposta e de recuperação; freqüência de amostragem; estabilidade operacional e reprodutibilidade dos resultados, entre outros. (Arya *et al.*, 2008, Rosatto, 2000)

3.2.1 – FUNCIONAMENTO DE UM BIOSSENSOR

Uma característica dos biossensores que os diferencia dos sensores químicos é a especificidade da análise. As divisões da química analítica e físico-química da UIPAC propuseram uma definição para biossensores: “um biossensor é um dispositivo que é capaz de fornecer informação analítica ”especifica”, quantitativa ou semi-quantitativa usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) o qual está em contato espacial direto com um elemento de transdução”. Então, de um modo geral, um biossensor é formado de duas partes: o componente biológico e o transdutor. 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 tal como: corrente, potencial, variação de temperatura, etc. (Salgado, 2001; Perez, 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 convertidos em um sinal elétrico quantificável e processável pelo uso de um transdutor adequado (Figura 3.5) (Arya *et al.*, 2008).

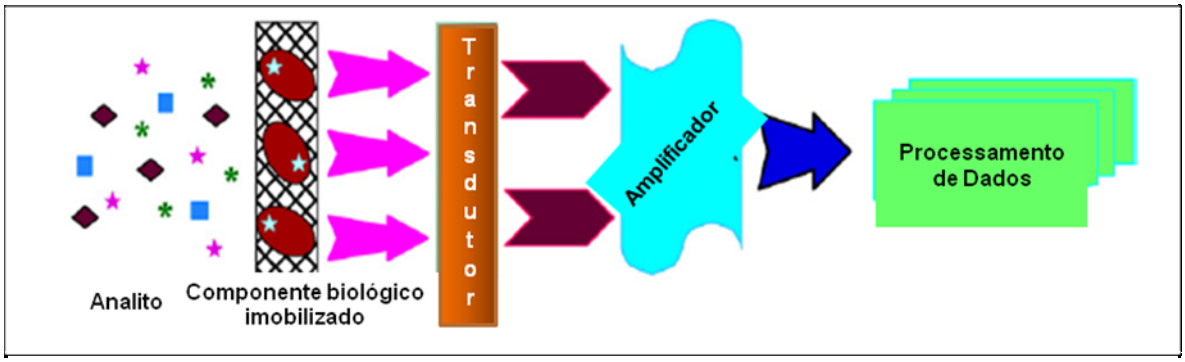


Figura 3.5: Esquema geral de funcionamento de um biossensor (Arya, *et al.*, 2008).

3.2.2 – COMPONENTE BIOLÓGICO

A seletividade, habilidade para discriminar um entre diferentes substratos, que é uma das características mais importantes de um biossensor, é uma 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 *et.al*, 2002).

Alguns requisitos básicos são exigidos na escolha de um biocomposto para atuar como elemento de reconhecimento biológico, como disponibilidade de um sítio reativo que posso reagir/ interagir com o analito, estabilidade face ao meio e as condições de medição e possibilidade de modificação/ imobilização sobre suporte por método químicos sem afetar o seu desempenho (Salgado, 2001). Baseado nestas exigências alguns biocompostos se adéquam para o uso na composição dos sensores (Figura 3.6). Assim de acordo com a sensibilidade do biocomposto utilizado para a sua construção os biossensores podem ser divididos em várias classes (Figura 3.6), mas dentre as classes existentes quatro são as mais desenvolvidas, que são dos biossensores enzimáticos, microbiológicos, os quimioreceptores e os imunossensores.

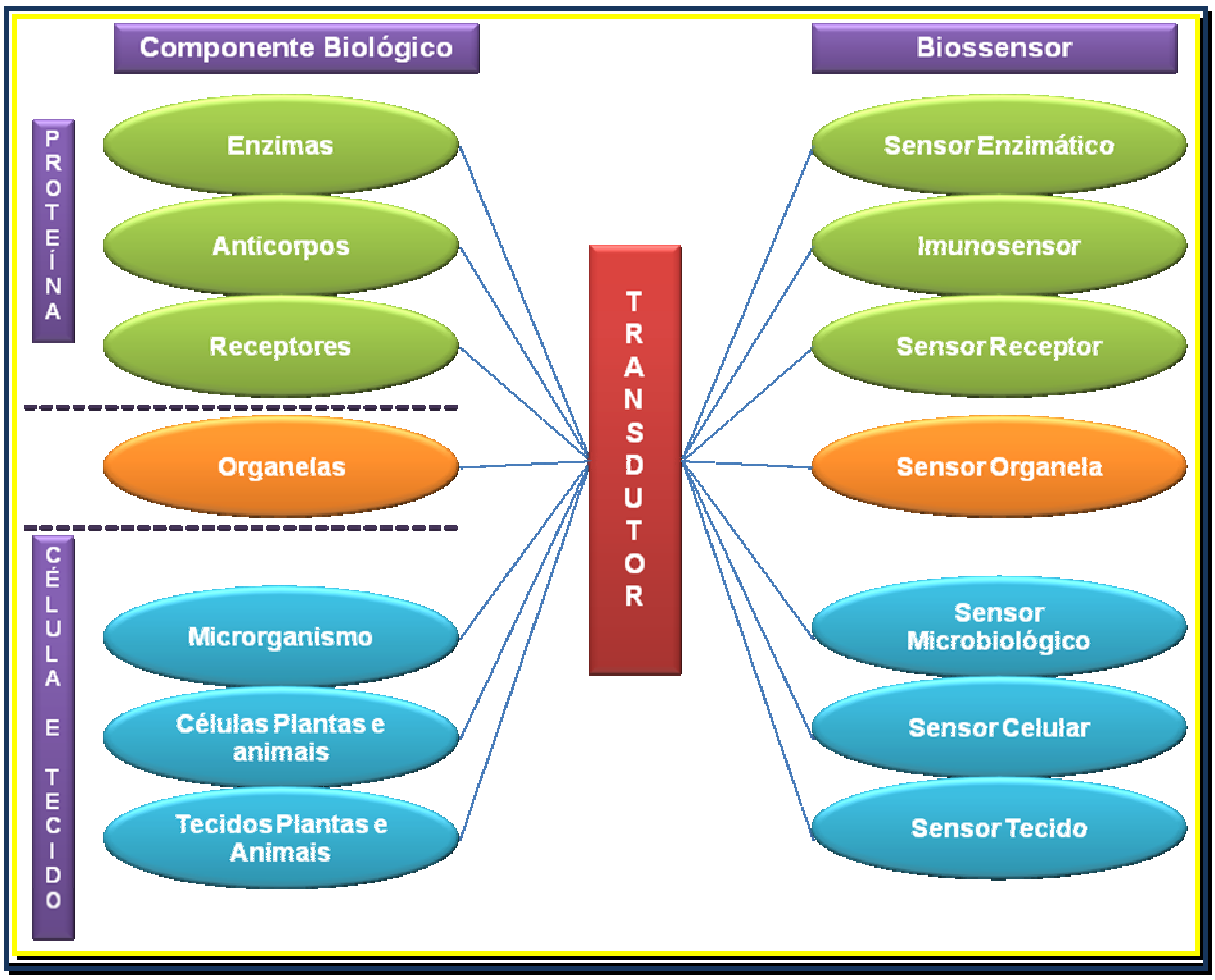


Figura 3.6: Classificação dos biossensores de acordo com o Elemento Biológico Sensível (Salgado, 2001).

Biossensores Enzimáticos

A maior parte dos biossensores desenvolvidos utiliza como componente biológico enzimas, em geral imobilizadas. A vantagem do uso deste componente é que as enzimas são catalisadores biológicos altamente específicos e seletivos. Comparados com os catalisadores químicos, as enzimas apresentam um alto nível de especificidade com o substrato, devido principalmente á ligação forte na molécula de substrato pelo seu sitio ativo envolvendo fatores do meio ambiente reacional tais

como, tamanho da molécula substrato, polaridade, grupos funcionais ligados e relativa energia de ligação.

Uma desvantagem em relação ao uso de enzimas na construção de um biossensor é o fato de apresentar uma estabilidade relativamente baixa, principalmente no que diz respeito a variação das condições físico-químicas do meio reacional, mas que podem ser contornados usando as condições adequada de pH, temperatura e pressão que garantam a manutenção da atividade enzimática.

Biossensores Microbiológicos

Os biossensores microbiológicos são formados por um microrganismo imobilizado, sensível e que especificamente reconhece a espécie de interesse, interligada a um adequado sistema de transdução.O princípio de funcionamento dessa classe de biossensores envolve assimilação do composto orgânico pelo microrganismo, acompanhado por uma variação na atividade respiratória ou na produção de metabolitos, que são monitorados diretamente por um transdutor.

Imunossensores

Utilizam proteínas globulares de soro (tais como imunoglobulinas) que formam parte de um importante grupo de proteínas altamente ligáveis. Anticorpos ligam-se a substâncias particulares (antígenos) com alta especificidade e alta afinidade. O principal problema deste biossensor é o elevado peso molecular dos anticorpos que dificulta a sua adaptação ao transdutor.

Quimioreceptores

Trata-se de um sistema que utiliza proteínas que interagem com espécies químicas, tais como hormônios, resultando em variações conformacionais. Apresentam problemas de ligação ao transdutor, dificuldade de manipulação e um tempo de vida curto.

3.2.3 – TRANSDUTOR

A escolha do transdutor é realizada mediante três requisitos básicos: que ele seja adequado para adaptação ao material biológico imobilizado, que seja altamente especifico 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 (Salgado 1997; Mello e Kubota, 2002).

Dos vários transdutores empregados na construção dos biossensores, os mais utilizados são os eletroquímicos, óticos e calorimétricos. Na Tabela 1.1 encontram-se os vários sistemas de transdução, seus modos de medição e aplicação típica (Mascini, *et al.*, 2001; Habermuller, *et al.* 2000).

Tabela 3.1: Tipos de transdutores empregados em biossensores

Sistema Transdução	Modo de Medida	Aplicação Típica
Eletroquímico		
Condutimétrico	Condutância	Reação catalizadas por enzimas
Eletrodo enzimático	Amperométrico (corrente)	Substratos enzimáticos e sistemas imunológicos (antígenos/anticorpo)
Transistores de Efeito de campo (FET)	Potenciométrico (voltagem)	Íons, gases, substratos enzimáticos e analitos imunológicos
Eletrodo íons seletivos (ISE)	Potenciométrico (voltagem)	Ions em meio biológicos, eletrodos enzimáticos, imunoeletrodos
Eletrodo sensíveis a gases	Potenciométrico (voltagem)	Eletrodo de gases, enzimas, organelas, células ou tecidos, imunoeletrodos enzimáticos
Impedimétrico	Impedância	Imunosensores enzimáticos
Cristais Piezo Elétricos, Equipamentos de superfície acústica	Variação de massa	Gases voláteis, vapores e analitos imunológicos
Optoeletrônicos, fibras óticas	Óticos	pH, substrato enzimáticos, analitos imunológicos
Termistores, Diodos	Termométrico/ calorimétrico (calor)	Enzimas, organelas, células integradas ou tecidos, sensores para substratos, gases, poluentes, Antibióticos, vitaminas, analitos imunológicos

Assim como os bissosensores foram classificados de acordo com o componente biológico utilizados, pode-se também fazer uma classificação de acordo com o sistema de transdução utilizado. Desta forma, os biossensores podem ser classificados em: Eletroquímicos (Amperometricos, Potenciometrico e Condutimétrico), Calorimetricos ou Óticos.

BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Essa classe de biossensores se caracteriza por serem, simples, sensíveis, confiáveis, de resposta rápida, necessitam de instrumentação de baixo custo, operam em condições em que não é necessário um pré-tratamento da amostra e permitem efetuar determinações em uma ampla faixa de concentração.

As técnicas eletrostáticas são capazes de fornecer limites de detecção excepcionalmente baixos e uma abundância de informações que caracterizam e descrevem eletroquimicamente determinados sistemas, sempre baseado nas propriedades elétricas de uma solução de analito quando ele esta 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 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).

Dependendo do princípio de medição estes podem ser divididos em amperométricos, potenciométricos e condutimétricos.

BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS

O principio de funcionamento de um biossensor amperometrico é a medida da corrente produzida por uma reação química entre espécies eletroativas. Esta reação química 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 (Demir *et al.*, 2008).

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, 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 misturadas em pasta de carbono (Romani *et al.*, 2000).

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

BIOSSENSORES POTENCIOMÉTRICOS

Os biossensores potenciométricos em geral utilizam um eletrodo de referência (inerte) e um eletrodo operante, preferencialmente eletrodos gases ou íons seletivos, ambos em contato com a amostra, e se baseiam no desenvolvimento de um potencial significativo no eletrodo operante por acumulação da carga e portanto, densidade de carga aumentada na superfície do eletrólito. Desta forma, enzimas consomem ou produzem espécies químicas fortemente polares ou íons, em decorrência da catálise, e esta espécies são detectadas pelo eletrodo de íons seletivos e são transformadas em um sinal possível de ser lido e determinado (Cabral *et al*, 2003; Arya *et al.*, 2006).

Os eletrodos de íons seletivos apresentam as vantagens de serem rápidos, sensíveis, de baixo custo e apresentarem simplicidade na medição, onde somente a

medição do pH é necessária, não um sistema polarográfico como requer os sensores amperometricos. Em geral a faixa analítica destes sensores é de 10^{-1} a 10^{-5} mol e como sua resposta é logarítmica, já que o potencial elétrico desenvolvido pelo eletrodo é proporcional ao logaritmo da atividade do íon em solução, a precisão da medida é constante por toda sua faixa dinâmica (Salgado, 2001)

BIOSSENSORES CONDUTIMÉTRICOS

Poucos biossensores que utilizam transdutores condutimétricos têm sido desenvolvidos, em função da dificuldade de efetuar medidas condutimétricas com dispositivos simples, do sinal depender fortemente da temperatura (são sensíveis a variações de temperatura na ordem de ± 1ºC) e por não poder usar amostras sem diluição prévia.

Biossensores baseados na medição de condutância estão relacionados ao uso de enzimas que produzem ou consomem espécies iônicas, nas reações por elas catalisadas, alterando a condutividade global da solução. Muitas reações enzimáticas produzem uma variação de condutividade, mas somente poucas oferecem um sinal de magnitude estável. Equipamentos microeletrônicos contendo a enzima imobilizada têm sido usado no desenvolvimento de biossensores condutimétricos. O principio de funcionamento envolve um par de microeletrodos separados por uma solução de eletrólito contendo a enzima e a amostra a ser detectada. O campo elétrico é gerado pela aplicação de uma voltagem nos microeletrodos, onde ocorrem variações das concentrações de espécies polarizadas (Cabral *et al.*, 2003).

BIOSSENSORES ÓTICOS

A utilização de fibras óticas e sistemas óticos integrados ou de transdutores para medição em reações biológicas tem se tornado extremamente vantajosa, levando os biossensores óticos a terem uma especial atenção.

Devido a sua confiabilidade e grande variedade, os métodos óticos de transdução física são muito usados em análises bioquímicas para quantificação de determinadas substâncias. Estes métodos, tais como, absorção, fluorescência fosforescência, polarização, interferência, podem ser usados em sensores de estados sólidos, através do uso de um transdutor ótico associado a um componente biológico imobilizado, juntamente com um indicador ou não, formando um instrumento definido como Biossensor ótico. O seu princípio se baseia em que, algumas reações enzimáticas alteram a propriedade ótica de determinadas substâncias e a luz emitida por este elemento biológico ou sua resposta a iluminação pode ser convenientemente transmitida via fibra ótica e monitorada em equipamento ótico (Hall, 1990).

BIOSSENSORES CALORIMÉTRICO

Algumas reações biológicas são acompanhadas por uma considerável liberação de energia permitindo que estas sejam quantificada calorimétricamente, relacionando-se a evolução de calor gerado com a quantidade de substrato reagido ou produto formado. Os biossensores calorimétricos permitem este acompanhamento, embora tenham as desvantagem de apresentarem altos custos, serem altamente complexos e terem baixa especificidade na análise, pois toda

variação de entalpia ocorrida seja na reação de mistura ou pelo efeito da diluição e solvatação ou mesmo perda de calor para o exterior, contribui para o resultado final ocasionando possíveis erros de análise (Spink *et al.*, 1976).

3.2.4 – APLICAÇÃO DOS BIOSSENSORES

O emprego industrial dos biossensores tende a crescer, em particular nas indústrias químicas e demais setores correlatos, o que incluí a indústria farmacêutica e de alimentos. Assim um vasto campo de aplicação está em constante desenvolvimento e alguns eletrodos enzimáticos, já se apresentaram bem estabelecidos para análises de diagnósticos.

A capacidade destes sensores em determinar de forma seletiva analitos em amostras complexas, apresentarem rapidez de análise, a diminuírem custo e resíduos gerados por análise, tem atraído o interesse de diferentes áreas como medicina, ambiental, alimentícia, e da biotecnologia na sua aplicação. A maior motivação é a possibilidade de monitorar continuamente "*in vivo*" ou "*on-line*" estes processos. As características dos biossensores são vantajosas em relação aos eletrodos convencionais ou a técnicas "*off-line*" que utilizam HPLC ou espectroscopia de massa, uma vez que estas técnicas convencionais requerem preparação da amostra, equipamentos caros e um longo tempo de processamento.

Na área de analises clínica uma aplicação importante dos biossensores está relacionada com o controle de glicose em pacientes com diabete e mais recentemente no controle do colesterol (Arya *et al.*,2008).

Na indústria biotecnológica, os biossensores têm sido largamente utilizados para detecção de vários nutrientes, em especial podemos citar fontes de carbono (glicose, amido, etc.) presentes nos meios de cultivo de bactérias, leveduras e fungos filamentosos e na indústria alimentícia e fermentativa de levedura de pão, de cerveja e vinho (Campanella *et al.*, 2008; Cabral *et al.*, 2003).

Na área ambiental, 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. Mais recentemente, os biossensores tem tido uma utilização crescente com o desenvolvimento de dispositivos analíticos com capacidades de resposta em tempo real, na detecção e monitoração de agentes químicos e biológicos perigosos.

Da grande maioria dos biossensores utilizados nas mais diferentes áreas, os biossensores enzimáticos eletroquímicos apresentam-se como predominantes.

3.3 – ENZIMAS

Enzimas são, em sua maioria, proteínas de elevado peso molecular, com propriedades catalíticas específicas presentes em todos os seres vivos. Elas possuem uma estrutura tridimensional complexa de uma ou várias cadeias polipeptídicas. Muitas enzimas também contém constituintes não peptídicos, como por exemplo, uma considerável quantidade de resíduos de carboidratos. Como outros catalisadores elas aceleram as reações promovendo o alcance do equilíbrio sem alterá-las, através da diminuição da energia de ativação. Além da sua função catalítica, enzimas são caracterizadas por sua alta especificidade. Elas catalisam

uma certa espécie de reação química com um único reagente ou um número de reagentes estruturalmente similares. Dessa forma, a razão principal para o amplo uso de enzimas em biossensores envolve sua “especificidade” e suas propriedades catalíticas. As reações catalisadas por enzimas podem ser usadas para a determinação de substratos, ativadores, inibidores e também da própria enzima (Lehninger, 1989.).

A classificação de enzimas envolve uma divisão de seis grupos principais de acordo com o tipo de reação que elas catalisam: 1 – óxido – redutase , 2 – transferase , 3 – hidrolase, 4 – liases, 5 – isomerase, 6 – ligase. Dentro de uma classe, por exemplo, as óxido – redutases, são subdivididas conforme o grupo prostético: flavina, quinona, heme ou cobre.

Muitas são as enzimas que podem ser utilizadas em biossensores. Os reagentes consumidos ou produtos formados podem ser detectados ou medidos através de transdutores. Contudo, existe uma classe de enzimas que, em comparação com os outros grupos, tem sido especialmente utilizado: as óxido-redutases. Este grupo de enzimas catalisa reações de oxido-redução ou redox que envolvem processos de transferência de eletrons na conversão enzimática do reagente em produto (Lehninger, 1989; Cabral, 2003).

Atualmente cerca de 50 tipos de enzimas entre elas podemos citar as fosfatases, esterases, nucleases, descarboxilase, vêm sendo estudadas visando sua futura utilização na confecção dos biossensores. Isto se deve ao crescente aumento da utilização de enzima nos diagnósticos clínicos, já que para tais fins estas devem possuir elevado grau de pureza, implicando na utilização de processos de purificação complexos e dispendiosos

3.3.1 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Dentre os parâmetros analisados de uma enzima a atividade enzimática, corresponde a um ponto chave para avaliação do potencial de aplicação desta no desenvolvimento de um biossensor.

A velocidade inicial de uma reação enzimática é diretamente proporcional ao numero de sítios ativos presentes, quando a concentração de substrato não esta em níveis de saturação e outras variáveis são otimizadas e mantidas (Lehninger, 1989).

A saturação do substrato (elevada concentração) limita a reação apenas pela concentração da enzima. Nestas condições, a atividade enzimática pode ser estimada pelo acompanhamento da velocidade reacional.

A atividade enzimática é função direta da estruturas terciária e quaternária da enzima. Todo tratamento que modifique a conformação da enzima como aquecimento, alteração do pH do meio e outros, modifica também a estrutura do sítio ativo diminuindo suas propriedade catalíticas.

A unidade de atividade enzimática, U, é estabelecida através da medida da velocidade de reação a partir de uma quantidade de substrato consumido (ou produto formado), em uma unidade de tempo. Geralmente é definido como quantidade de enzima capaz de converter 1 umol de substrato por minuto em pH e temperatura adequada para cada tipo de enzima.

Um grande número de outras definições de unidade de atividade tem sido usados. Uma nova unidade internacional para atividade enzimática é recomendada pela *Enzyme Commission* (Lehninger 1989) denominada Kat que é definida como a quantidade de enzima que transforma 1mol por segundo de substrato a 25ºC. A

nova unidade está de acordo com as dimensões das constantes de velocidade em cinética química, sendo expressa também em termos de seus submúltiplos, mili (m), micro (μ) e nano (n) katals. Assim, 1 kat é igual a 6×10^7 unidades de atividade ou a 6×10^7 umol/min de substrato. O kat não é usado freqüentemente, embora seja uma unidade recomendada pelo Sistema Internacional de Unidade. Ainda segundo Lehninger (1989) outras expressões de atividade também podem ser usadas.

Atividade específica – expressa em unidade de enzima por miligrama de proteína (U/mg).

Atividade molecular – expressa como unidade por μmol de enzima em condições ótimas de substrato (número de moléculas de substrato transformado por minuto por molécula de enzima).

Existem fatores que afetam as reações enzimáticos atuando no mecanismo cinético dessas reações, podendo aumentar ou diminuir a velocidade reacional, pela modificação na estrutura dos sítios das diferentes enzimas e conseqüentemente alterando a atividade catalítica. Os principais fatores são: concentração do substrato, concentração de enzima, presença ou ausência de ativadores e inibidores, temperatura, pH e força iônica da solução (Lehninger, 1989; Cabral *et al*, 2003).

3.3.2 – TANASE

Tanino-acil-hidrolase (E.C. 3.1.1.20), usualmente chamada de tanase, é uma enzima que catalisa a hidrólise de ligações ésteres e depsídicas de vários taninos hidrolisáveis, como o ácido tânico. Esta enzima pode ser encontrada em diferentes vegetais, porém seus principais produtores são os microrganismos, destacando-se

os fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. (Chang *et al.* 2006; Leka e Losane, 1997; Aguilar e Guitiérrez-Sánchez 2001, Pinto et.al,2005)

A aplicação indústrial da tanase, (E.C. 3.1.1.20), é bastante diversificada, sendo usada na produção industrial de ácido gálico cujo éster é utilizado como agente conservante, na indústria de alimentos para remover certas substâncias indesejáveis, na indústria de ração animal, e no tratamento de efluentes de curtumes.

Na indústria de alimentos sua maior aplicação é no tratamento de folhas ou extratos de folhas de chá, para reduzir o surgimento de turbidez em bebidas geladas, devido a presença de taninos. A tanase apresenta também grande potencial de aplicação em sucos de frutas tropicais ricos em taninos.

3.3.2.1 – AÇÃO DA ENZIMA TANASE

A decomposição de taninos hidrolisáveis é mediada por duas enzimas. Uma com atividade esterásica sobre a ligação éster entre o grupo anel aromático e o resíduo de glicose e outra depsidásica sobre a ligação éster entre os anéis aromáticos (Figura 5.1). Haslam e Stragroom (1966) identificaram que a Tanase era a responsável pelas duas atividades. Também relataram em seu trabalho que a proporção entre duas frações podia variar de acordo com as condições de cultivo. Beverini e Metche (1990), utilizando colunas de afinidade, fracionaram duas isoformas de Tanase fúngica. Ambas apresentaram as duas atividades, contudo a Tanase I possui maior característica esterásica, enquanto na Tanase II a atividade depsídica é mais pronunciada.

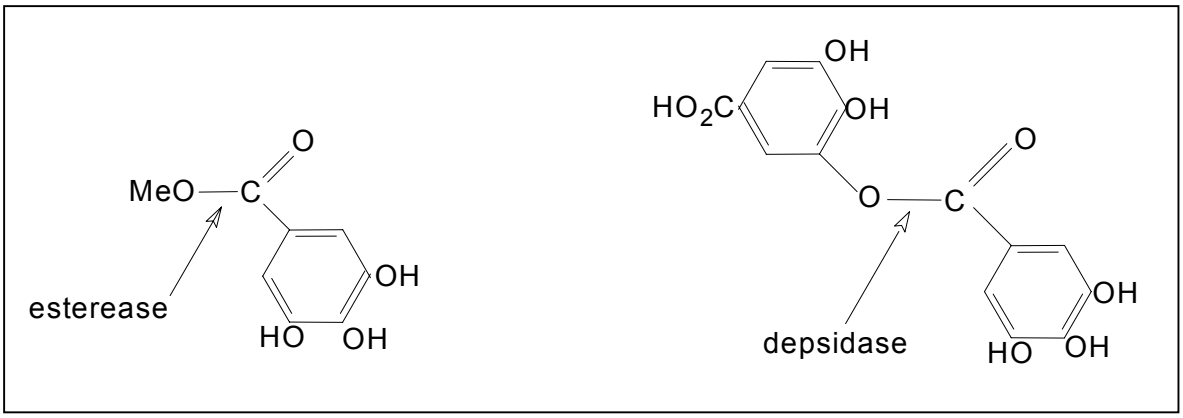


Figura 3.7: Atividade esterásica e depsidase da Tanase (Pinto *et al*, 2005)

A Figura 3.8 apresenta um modelo proposto para a degradação do ácido tânico pela Tanase. Inicialmente, a Tanase rompe as ligações depsídicas da molécula de ácido tânico liberando, 1,2,3,4,6-pentagaloilglicose e quatro moléculas de ácido gálico. Em seguida, os demais resíduos galoil, ligados ao núcleo glicosídico, são seqüencialmente removidos até a liberação da molécula de glicose e de outras cinco moléculas de ácido gálico (Leka e Losone, 1997; Pinto *et al.*, 2005).

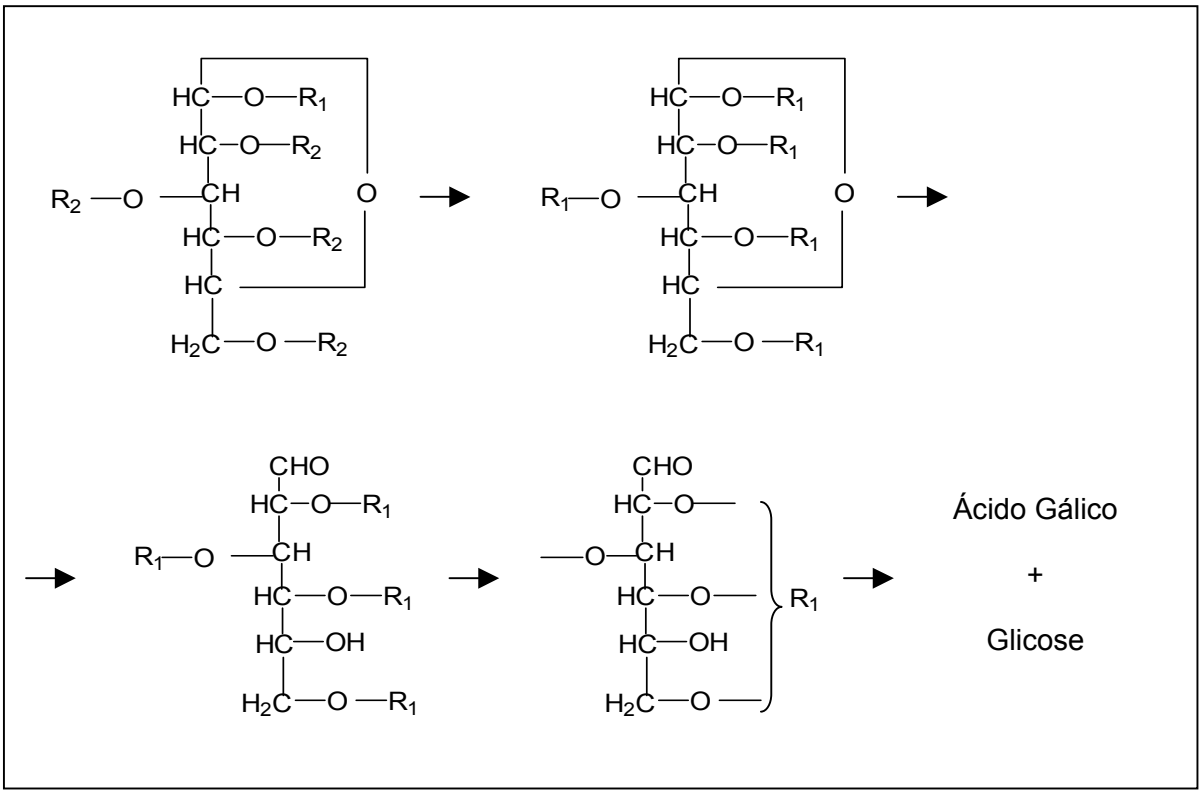


Figura 3.8: Etapas da degradação do ácido tânico pela Tanase

3.3.2.2 – FONTE DE OBTENÇÃO DA ENZIMA TANASE

A tanase pode ser obtida a partir de fontes vegetal, principalmente em plantas rica em taninos, de animal, que pode ser extraída da mucosa do intestino dos ruminantes ou fonte microbiana (Sasakia, *et al.*, 2005;).

A principal fonte de obtenção de tanase é a microbiana, pois a produção desta enzima é mais estável do que as similares obtidas a partir de outras fontes. Alguns microrganismos podem produzir tanase em grandes quantidades e de modo constante. Além disso, os microrganismos podem sofrer modificações a partir de

novas técnicas, como a manipulação genética, que poderá resultar em um aumento na produção e na atividade da tanase (Leka e Losone, 1997).

A tanase pode ser sintetizada por algumas bactérias, leveduras e fungos filamentosos. É relatado que bactérias são muito sensíveis à presença de ácido tânico, mas apenas bactérias da espécie *Bacillus, Corybacterium, Streptococcus bovis* e *Selenomonas ruminantium* foram capazes de crescer na presença deste composto e degradá-lo (Sasakia *et al.*, 2005; Aguilar e Guitiérrez-Sánchez 2001). *Candida sp*. foi a única levedura que produziu tanase na presença de acido tânico.

A classe de microrganismo mais estudada para a produção de tanase é a dos fungos filamentosos entres eles podemos citar *Ascochyta, Aspergillus, Chaetomium Mucor, Myrothecium, Neurospora, Rhizopus, Trichothecium e Pencillium*.

Apesar de vários microrganismos produzirem tanase, estas não são igualmente ativas com todos os taninos hidrolizáveis. As tanases de levedura são efetivas somente na decomposição do ácido tânico, em contrapartida as tanases bacterianas e fúngicas são eficientes na degradação de ácido tânico e outros taninos hidrolizáveis que ocorrem na natureza (Pinto, *et al.* 2005).

3.3.2.3 - PROPRIEDADES DA ENZIMA TANASE

A tanase é um glicoproteina formada por um mistura de esterase e depsidade. O conteúdo de carboidratos pode variar de 25,4 a 66,2% do peso total da enzima O papel exato desses elevados conteúdos de carboidratos não é conhecido, suspeita-se que seja a maneira de proteger o núcleo protéico da ação desnaturante dos taninos hidrolisáveis e de direcionar o substrato ao centro ativo da enzima para

possibilitar a quebra desse em seus respectivos componentes, glicose e ácido gálico (Aguilar e Guitiérrez-Sánchez, 2001) A tanase apresenta ponto isoelétrico entre 4,0 e 4,5 e peso molecular entre 186 e 300 KDa. Contudo certas propriedade da enzima depende das condições de cultivo.

Sua estabilidade em diferentes valores de pH pode variar entre faixas estreitas (5,0 a 5,5) e amplas (3,5 a 8,0), dependendo da fonte de obtenção da enzima. Em geral apresenta pH ótimo em torno de 5,5, porém em alguns relatos da literatura é observado a presença de dois picos de pH ótimos. Tal falto é atribuído à dupla especificidade de ação da tanase. Um dos valores corresponderia a ótima atividade esterásica enquanto o outro corresponderia a atividade depsidásica (Lekha e Lonsane, 1997, Pinto, *et al.*, 1997). A temperatura ótima para atividade desta enzima ocorre, em geral, próxima a 30°C e 40ºC (Chang *et al.*, 2006).

A estabilidade da tanase ao pH ocorre em uma ampla faixa para várias linhagens microbianas. Entretanto, as tanases produzidas por *A. flavus* IFO 5839, A. niger AN11 e P. chrysogenum enquadraram-se em faixas bem mais estreitas (5,0 a 5,5; 5,0 a 6,5 e 4,5 a 6,0, respectivamente). Para a temperatura, a estabilidade da tanase ocorre basicamente entre 10°C e 45ºC (Aguilar e Guitiérrez-Sánchez 2001)

A tanase tem a sua atividade inibida por íons metálicos como Cu^{2+}, Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} e é inativada por diferentes substâncias como *o*-fenantrolina, PMSF, EDTA, 2-mercaptoetanol, etileno diamina e tioglicolato de sódio (Bratali Kar, *et al.*, 2003).

3.4 – IMOBILIZAÇÃO DO COMPONENTE BIOLÓGICO

A imobilização de enzimas teve um desenvolvimento muito grande nos últimos anos, visto que as vantagens desta técnica vêm sendo, ao longo deste tempo, avaliada e utilizada nas, mais diversas áreas. Uma das razões para a grande expansão da tecnologia da imobilização está ligada ao material de suporte, que pode agir sobre a estabilidade e a eficiência da enzima imobilizada. Quando a enzima está em solução seu comportamento é igual ao de qualquer soluto em que há uma dispersão na solução e os movimentos são livres, porém quando imobilizadas estes movimentos são restritos (Giorno e Drioli, 2000). Para um biossensor a escolha de um método de imobilização apropriado depende do tipo de transdutor usado, da natureza do analito e das suas condições de operação. Algumas propriedades devem ser observadas na escolha da matriz de imobilização, tais como: características físicas (área superficial, não compressibilidade, resistência, grau de porosidade), químicas (hidrofibicidade, grupos funcionais passíveis de modificação), estabilidade (mecânica e de estocagem), aspectos econômicos (custo – beneficio, impacto ambiental, equipamentos e reagentes requeridos) e reações (limitações de transferência de massa, de substância, de co-fatores e de produtos) (D'Souza, 2002).

As enzimas podem ser imobilizadas sobre um transdutor ou em uma matriz suporte através de métodos físicos e químicos. Métodos como oclusão e adsorção provocam pouca perturbação sobre a função e a estrutura da enzima e podem ser aplicados a muitas delas (Kennedy *et al.* 1988). Já os químicos são mais drásticos e podem levar a uma perda da atividade enzimática, por isso devem ser utilizados com

cautela. O uso dos métodos químicos de imobilização geralmente conferem ao biossensor melhor estabilidade operacional (Yesiloglu, 2005). Nestes métodos estão incluídos os de ligações cruzadas e ligações covalentes.

Quando uma enzima é imobilizada, algumas de suas características podem alterar-se (Worsfold, 1995):

Estabilidade – a velocidade de desnaturação de uma enzima imobilizada é menor do que de uma livre, pois está protegida como se estivesse em seu ambiente natural.

Constante de Michaelis-Menten – geralmente há um aumento no valor de Km devido à modificação na estrutura tridimencional da enzima o que reflete diretamente no abaixamento da atividade catalítica.

pH – o pH ótimo para a atividade enzimática sofre uma mudança, podendo aumentar a faixa, onde não há perda de atividade da enzima imobilizada, em até uma unidade de pH.

A utilização de enzimas em química analítica tem sido cada vez mais explorada no sentido de converter enzimas solúveis em imobilizadas, aprisionado-as nos mais diversos suportes inertes, nos quais as enzimas mantém suas propriedades catalíticas por maior tempo, podendo ser empregada em um maior número de análises (Mateos *et al.*, 2000; Fernandez-Lorente *et al.*, 2001).

Cada enzima é única em suas características e isto influencia na escolha do procedimento de imobilização. Entretanto, a obtenção de um biossensor com estabilidade operacional depende, da estabilidade do suporte e do tipo de amostra, a qual pode conter diferentes ativadores e/ou inibidores. Como não existe um método

ideal ou procedimento geral para a imobilização do componente biológico, a diversidade de métodos existentes permite a escolha de um que promova uma melhor imobilização e menor perda da atividade enzimática (Mateo, et.al, 2000). Dentre os mais importantes destacam-se: ligação covalente, ligação covalente cruzada, oclusão, adsorção e encapsulação (Figura 3.9)

Figura 3.9: Classificação dos métodos de imobilização de enzimas

3.4.1 – IMOBILIZAÇÃO POR ADSORÇÃO

Neste método, a imobilização ocorre principalmente através de interações entre o suporte e a enzima. Estas interações são do tipo Van der Walls ou pontes de hidrogênio, que embora fracas ocorrem em número suficiente para que a imobilização seja possível. Entre os adsorventes mais utilizados estão o quartzo, o vidro, o carvão, a sílica-gel , a celulose e as resinas de troca iônicas (Kennedy *et al.*,

1998). A grande vantagem do método reside na simplicidade e nas condições brandas como é realizado, preservando a atividade enzimática. Alem disso, é rápido, simples e barato (Bailiy e Ollis, 1986).

Apesar destas vantagens, devido as interações envolvidas, com o decorrer do tempo há uma dessorção progressiva das moléculas de enzimas, além de serem altamente afetadas pelo pH, força iônica do meio, temperatura ou mesmo pelo substrato da enzima. Por isso, é importante o conhecimento e controle destes fatores para conseguir a imobilização das enzimas e mantê-las adsorvidas com atividade (Kennedy *et al.*, 1998; Yesiloglu *et al.,* 2005).

3.4.2 – IMOBILIZAÇÃO POR OCLUSÃO

Na oclusão, a imobilização da enzima acontece durante o processo de reticulação de um polímero insolúvel em água. A rede polimérica forma espaços vazios dentro dos quais a enzima fica livre na solução, diferente da adsorção e da ligação covalente, porém seus movimentos são limitados pela estrutura da rede (Yesiloglu, 2005; Boadi *et al*, 2001).

A grande dificuldade de transporte do substrato e do produto,através da estrutura do polímero, aumenta o tempo de resposta, assim como a perda contínua de enzimas pelos poros, constituem duas grandes desvantagens do método (Zanin, 1989; Mateo *et al.*, 2000).

3.4.3 - IMOBILIZAÇÃO POR ENCAPSULAÇÃO

Neste método, a enzima, fica dentro de microcápsulas delimitadas por uma membrana semipermeável que permite a passagem do substrato e dos produtos reacionais. Os principais tipos de membranas usadas são: acetato de celulose, policarbonato, colágeno, Teflon e Nylon. A difusão das espécies envolvidas no processo e a retenção de produtos dentro da cápsula são as principais desvantagens do método, uma vez que podem levar a um rompimento da membrana (Boadi, *et.al,* 2001; Zanin, 1989).

3.4.4 – IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA

Neste método de imobilização, as moléculas de enzimas ligam-se entre si por pontes intermoleculares, formando uma ampla rede tridimensional. A ligação cruzada envolve a formação de ligação covalente entre enzimas, utilizando para tal, agentes bi ou multifuncionais (glutaraldeído, hexa-metil-diisocianato entre outros). O grande problema destes reagentes é sua toxicidade que limita o seu uso em células vivas e em diversas enzimas (Mateo *et al.*, 2000; Yesiloglu, 2005).

O glutaraldeído é, dos reagentes polifuncionais, um dos mais utilizados devido ao baixo custo e baixa toxicidade quando comparado com os demais. As ligações que se formam entre a enzima e o glutaraldeído são estáveis diante dos efeitos de pH, força iônica, solvente e temperatura.

A maior desvantagem é que muitas enzimas são sensíveis á reação e podem perder a atividade catalítica, quando é utilizado glutaraldeido, já que não existe um procedimento específico para cada enzima. Entretanto, a efetividade da imobilização

depende das condições experimentais em que o procedimento é realizado, devido á multiplicidade de estrutura químicas possíveis em cada situação (Fernandez-Lorente *et al*., 2001).

3.4.5 – IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO COVALENTE

A imobilização por ligação covalente ocorre entre grupos reativos do suporte e grupos funcionais da enzima, que não sejam essenciais para a atividade catalítica da mesma. Os grupos funcionais potencialmente presentes na enzima estão mostrados na Figura 5.4. Basicamente, dois passos estão envolvidos na ligação covalente entre a enzima e o suporte. No primeiro, o suporte é ativado com o reagente especifico e no segundo, a enzima é adicionada para formação da ligação (Kennedy *et al.*, 1988).

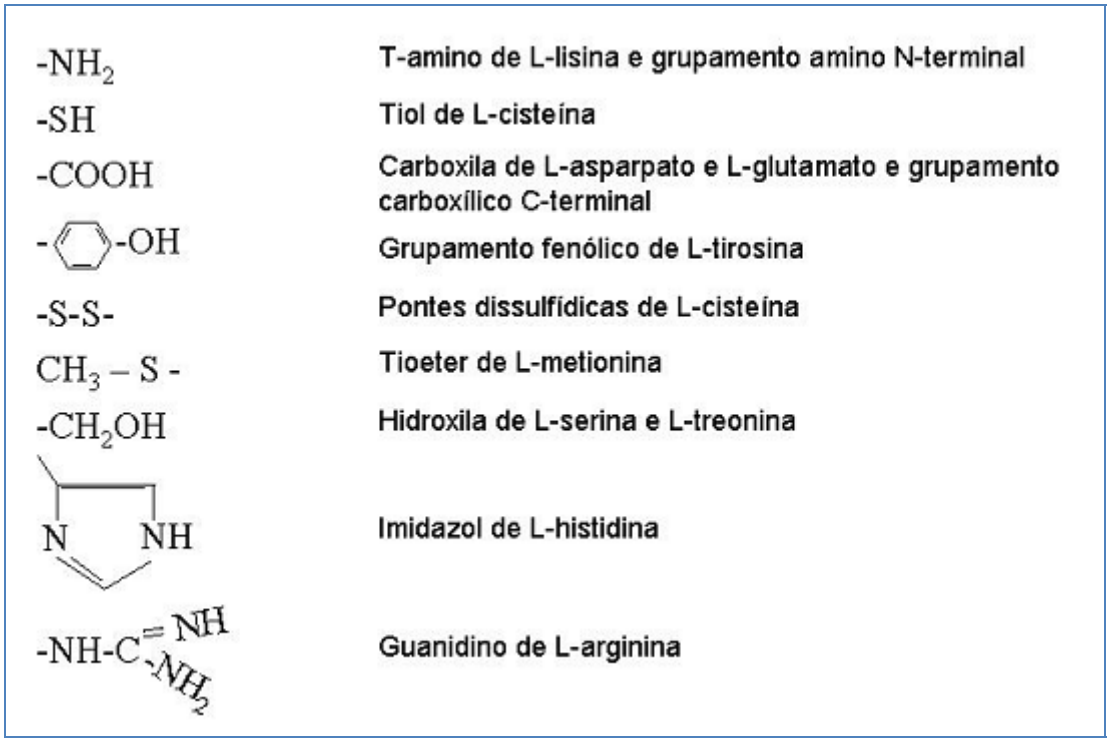


Figura 3.10: Grupamentos funcionais presentes nas enzimas

Esta técnica é simples e ocorre em baixas temperaturas, baixa força iônica e dentro do pH fisiológico. A escolha de reagente para promover a imobilização tem como pré-requisito o conhecimento do aminoácido presente no centro ativo da enzima, isto porque este aminoácido não deve reagir com o reagente de imobilização. Assim, se a enzima utilizar o grupo carboxil do centro ativo para participar da catálise, é conveniente que a ligação covalente entre a enzima e o suporte se faça através do grupo amino (Mateo *et al.* 2000; Kennedy et.al, 1988).

3.4.6 - INFLUÊNCIA DO GLUTARALDEIDO

Um dos agentes de ligação para estruturas protéicas mais disponíveis comercialmente, o glutaraldeido, tem encontrado ampla aplicação no processo de imobilização enzimática (covalente ou cruzada) em suportes sólidos para biossensores, tanto em reatores enzimáticos, como em cromatografia por bioafinidade e em pesquisa de imunossensores (Junior, 1999; Walt e Agayn, 1994).

A efetividade da imobilização com glutaralteido, depende diretamente das condições experimentais em que tal procedimento é aplicado, devido, como já citados, á multiplicidade das estruturas químicas possíveis em cada situação. Diferentes publicações tem mostrado que soluções aquosas de glutaralteido (25% ou 70%) representam misturas de multicomponentes. O pH desta solução é de aproximadamente 3,1 e pode ser explicado já que alguns dos grupos aldeídos são parcialmente oxidados a seus ácidos carboxílicos correspondentes, daí a redução do pH da solução.

A Figura 3.11 e 3.12 mostra algumas estruturas do glutaralteído em solução aquosa, ácida ou neutra. Todas as formas propostas para o glutaralteído podem reagir com proteínas formando produtos com estruturas monoméricas ou poloméricas

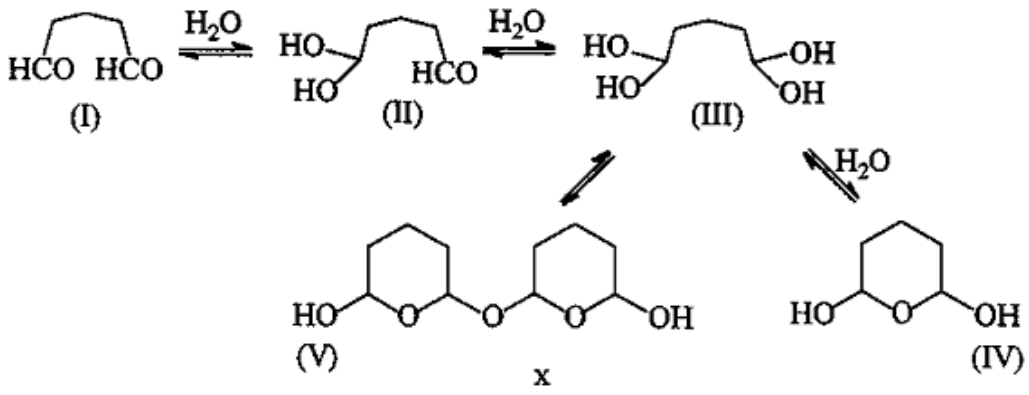


Figura 3.11: Formas propostas para o glutalradeído – aquosa, (I) liner-mono (II) e dihidratos (III), um hemiacetal cíclico (IV) e oligômeros (V).

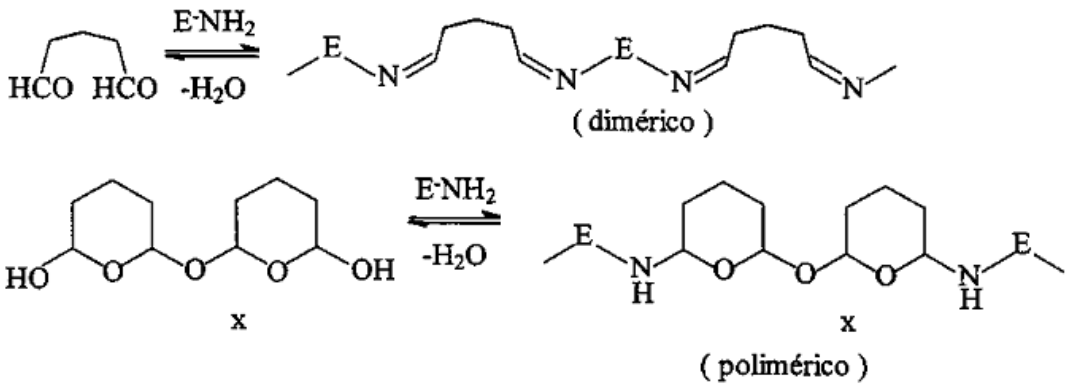


Figura 3.12: Estrutura do glutaralteído em solução ácida e neutra

Sob condições básicas, o glutaralteído submete-se a condensações aldólicas para formar aldeídos multiméricos α,β-insaturados de estruturas complexas, que podem reagir com grupos protéicos através da formação de bases de Schiff estabilizadas.

As estruturas do glutaralteído polimérico em ambas as formas, linear ou cíclica, mostram melhores capacidades de agente imobilizante em relação ao produto puro, sendo que o uso de glutaralteído para imobilização enzimática torna-se específico para cada estrutura protéica em particular, bem como sua aplicação. Após a imobilização enzimática apropriada, é necessário remover-se o excesso de glutaralteído não reagente, pelo uso de uma solução de glicina, para evitar problemas de interferência na determinação analítica.

Na confecção dos biossensores reações de imobilização de enzimas com agentes bifuncionais como glutaralteído em suporte sólidos tem sido amplamente aplicada mostrando eficiência no processo e mantendo o biocomponente ativo sem que haja perdas do mesmo durante a analise (Salgado, 1997; Folly, 1996, Alhadeff, 2005)

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

No presente capítulo, estão apresentados os principais materiais e reagentes utilizados, bem como a descrição das metodológicas aplicadas ao estudo de imobilização, caracterização e determinação das condições ótimas atuação do componente biológico utilizado e na seleção do sistema de transdução a ser utilizado no desenvolvimento de um biossensor enzimático para taninos hidrolisáveis.

4.1 – MATERIAIS E REAGENTES.

4.1.1 – Enzima

A enzima tanase foi adquirida a partir do produto comercial Biopectinase CT, gentilmente doada pela Quest International, produzida por A*spergillus niger*, batelada 502051.

4.1.2 - Suporte

O suporte utilizado (Figura 4.1) para o processo de imobilização foi pérolas de vidro aminopropil com tamanho de poro de 700 A^{o}/ 80-120 µm adquiridos da Sigma.

Figura 4.1: Fotografia do suporte utilizado – Pérola de vidro.

4.1.3 - Reagentes

A rodanina, e glutaralteído foram adquiridos da Sigma Chemical Co., Aldrich e enquanto que ácido gálico e o ácido tânico foram adquiridos da Vetec.. O Etanol 99% foi adquirido da Merck.

4.2 – METODOLOGIAS

4.2.1 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA TANASE LIVRE

A atividade enzimática da tanase livre foi determinada pela quantificação de ácido gálico, liberado a partir da hidrólise de ácido tânico (Figura 5.2), utilizando

rodanina em solução alcoólica, segundo método descrito por Sharmat *et al.* (2000) e adaptado por Pinto *et al.* (2006).

A reação enzimática deu-se em 10ml da solução de ácido tânico 0,02% (p/v) em tampão acetato 20mM pH 5,0, onde foi adicionado 0,25mL do complexo enzimático. A reação de hidrólise foi paralisada com a solução etanólica de rodanina 0,666% (p/v) que forma um complexo com o ácido gálico liberado (Figura 4.2). O complexo formado possui absorbância máxima a 520 nm, e as moléculas de rodanina que não reagiram, não apresentam em solução básica, absorbância em comprimentos de onda superiores a 450nm. A reação foi conduzida a 30ºC por 10 minutos (Anexo 01).

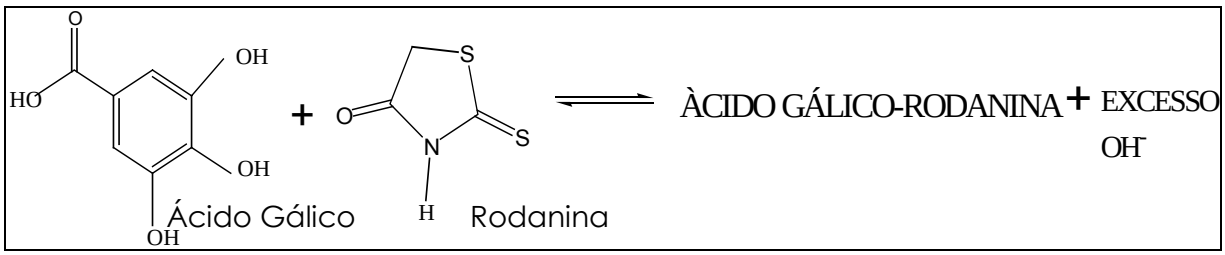


Figura 4.2: Formação do complexo: Ácido Gálico com a Rodanina

Neste trabalho, definiu-se que uma unidade (U) de atividade enzimática é a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido gálico por minuto de reação a pH 5,0 e 30°C.

O cálculo da atividade da enzima livre foi realizado através da Equação 4.1.

$$ATIV = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times Dil \times f \times 21}{170{,}1 \times 10} \qquad \text{Equação 4.1}$$

Onde:

ATIV → Atividade da tanase (U/mL)

$Abs_{amostra}$ → Absorbância da amostra

Abs_{branco} → Absorbância do branco (Anexo 02)

Dil → Diluição do complexo enzimático

f → Fator de conversão da curva padrão de ácido gálico (mg/L)

Na equação os valores 21, 170,1 e 10 representam a diluição da enzima no meio reacional, o peso molecular do ácido gálico (u.m.a) e tempo de reação (min), respectivamente.

4.2.1 – TÉCNICA DE IMOBILIZAÇÃO

O processo de imobilização utilizado no presente trabalho consistiu na ligação covalente da enzima a um suporte vítreo (pérola de vidro), no qual este suporte sofreu uma ativação anterior. O processo de ativação do suporte com o glutaralteído ocorre formando grupamentos aldeídicos necessários à ligação da enzima (Figura 4.3).

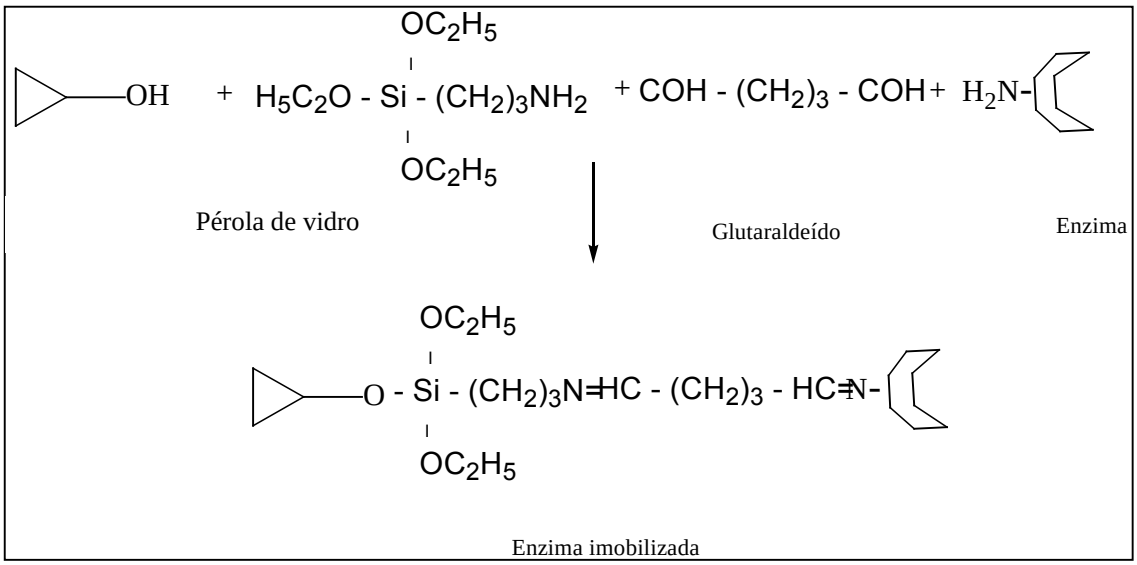


Figura 4.3: Descrição química da reação no processo de imobilização

A técnica de imobilização consiste em primeiramente ativar o suporte (pérola de vidro) com solução de glutaraldeído a 2,5% v/v em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 por uma hora à 30ºC na razão de 12,5mL de solução por grama de suporte, em seguida as pérolas são lavadas e colocadas em contato com uma solução de tanase em tampão acetato 20mM (pH 5,0) por 24h na razão de 20mL por grama de suporte. A eficiência da imobilização foi determinada em termos de atividade total do sobrenadante transferida para o suporte.

Para avaliar o processo de imobilização, quantificou-se a atividade hidrolítica da solução de enzima fornecida ao suporte e do sobrenadante ao final do processo de imobilização e da enzima imobilizada (derivado imobilizado). A partir destes resultados foi possível calcular a atividade recuperada da enzima imobilizada e o rendimento de imobilização que serão demonstradas no item a seguir.

4.2.2 – DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DA TANASE IMOBILIZADA

A atividade da tanase imobilizada foi determinada de acordo com Melo *et al* (2005), que adaptou o método de rodanina em solução alcoólica para tanase livre descrito por Sharmat *et al*. (2000) e adaptado por Pinto *et al* (2006).

O método consiste, na reação de hidrólise da solução de ácido tânico 0,05% (p/v) pela tanase imobilizada (Figura 3.8) que ocorre em tampão acetato 20 mM pH 5,0, sob agitação, à 50°C por 30 minutos. Em 20 mL de substrato (ácido tânico), foi adicionado 0,1 g de tanase imobilizada. A determinação da atividade da tanase imobilizada foi realizada através da quantificação do ácido gálico liberado após ação da enzima sobre o ácido tânico utilizando rodanina em solução alcoólica (Anexo 03).

Para esta metodologia, definiu-se que uma unidade (U) de atividade enzimática é a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido gálico por minuto de reação a pH 5,0 e 50°C.

O cálculo da atividade da enzima imobilizada, foi realizado através da Equação 4.2.

$$Ativ_{Derivado} = \frac{Coef * fator}{170{,}1 * massa} \qquad \text{Equação 4.2}$$

Onde:

$Ativ_{Derivado}$ → Atividade do derivado imobilizado (enzima imobilizada) (U/g)

Coef. → Coeficiente angular da curva que relaciona Abs x tempo de reação

fator → Fator de conversão da curva padrão de ácido gálico (mg/L)

170,1 → Peso molecular do ácido gálico (u.m.a.)

massa → massa do derivado (g) (enzima imobilizada)

O percentual de enzima que foi ligada covalente ao suporte foi calculado através da Equação 4.3 que expressa o rendimento de imobilização (Rend.). O rendimento de imobilização é a relação entre a diferença da atividade do sobrenadante antes e depois do processo de imobilização e a atividade inicial do sobrenadante.

$$\mathrm{Re}nd = \frac{(Ativ_{inicial} - Ativ_{final})}{Ativ_{inicial}} x\,100 \qquad \text{Equação 4.3}$$

Onde:

Rend. $\rightarrow$ Rendimento de imobilização (%)

$Ativ._{inicial}$ $\rightarrow$ Atividade livre inicial do sobrenadante (U/mL)

$Ativ_{final}$ $\rightarrow$ Atividade livre final do sobrenadante (U/mL)

A partir da Equação 4.4 foi possível determinar atividade recuperada da enzima imobilizada ($Ativ_{recuperada}$). Atividade recuperada pode ser definida como a relação entre a quantidade de atividade retida no suporte e a diferença da quantidade de atividade presente no sobrenadante antes e depois do processo de imobilização.

$$Ativ_{recuperada}. = \left(\frac{Ativ._{derivado}}{(Ativ._{inicial} - Ativ._{final})} \right) x\ f\ x\ 100 \qquad \text{Equação 4.4}$$

Onde:

$Ativ_{Recuperada}$ → Atividade recuperada do derivado imobilizado

$Ativ_{derivado}$ → Atividade do derivado imobilizado (enzima imobilizada) (U/g).

$Ativ._{inicial}$ → Atividade livre inicial do sobrenadante (U/mL)

$Ativ_{final}$ → Atividade livre final do sobrenadante (U/mL)

f → fator que correlaciona a quantidade de uporte e o volume de imobilização utilizados (g/mL)

Em todos os experimentos os valores de atividade medidos foram expressos em percentuais, considerando como 100% o valor máximo da atividade medida e os demais em percentuais calculados relacionados a este. A esta medida denominamos *atividade resídual.*

4.2.3 – DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA IMOBILIZAÇÃO SOBRE O PERFIL DE ATIVIDADE DA ENZIMA.

4.2.3.1 - *pH*

A variação do pH do meio de reação pode provocar mudanças conformacionais no sítio ativo da enzima ou ainda alterar as concentrações entre espécies carregadas, substrato, produto, íons hidrogênio, íons hidroxila, tanto no microambiente da enzima imobilizada quanto no meio reacional (macroambiente).

Para avaliar o efeito do pH do meio reacional na atividade da enzima imobilizada, as soluções de substrato (ácido tânico) foram preparadas usando diferentes soluções tampão de valores de pH variando de 3.0 a 8,0. Para soluções na faixa de pH entre 4 e 6, utilizou-se solução de tampão acetato. Para valores

acima e abaixo desta faixa, utilizaram-se soluções de tampões citrato e fosfato, respectivamente. A atividade catalítica foi determinada segundo procedimento descrito no item 4.2.2 a 30ºC por 30 minutos.

4.2.3.2 –*TEMPERATURA*

Uma reação catalisada por enzimas, diferentemente de uma reação não-catalisada, possui duplo efeito na relação temperatura-reação. Até uma dada faixa de temperatura, o efeito predominante será o aumento da velocidade da reação, como prevê a teoria da cinética química representada através da equação de Arrhenius. A partir de um determinado ponto, um fator oposto, a desnaturação térmica, tornando-se cada vez mais importante, até que, acima de um certo limite, a rápida desnaturação destruirá a função catalítica da enzima. Mas as faixas de temperatura onde ocorrerão tais fenômenos dependem do tipo de enzima. Assim para avaliar a influência da temperatura na atividade da enzima imobilizada, foram realizados ensaios em diferentes valores de temperatura variando de 15 a 70°C em tampão acetato 20mM pH 5,0 por 30 minutos de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.2.

4.2.4 – DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE FATORES EXTERNOS E OPERACIONAIS SOBRE A ESTABILIDADE DA ENZIMA IMOBILIZADA.

4.2.4.1 - *pH*

A estabilidade da enzima imobilizada para hidrólise do ácido tânico com relação ao pH, foi estudada incubando a enzima imobilizada em soluções de tampão acetato 20mM nos valores de pH 4,0 a 6,0 a 30ºC durante 5 horas. A cada 30

minutos até completar duas horas, e depois de hora em hora até completar 5 horas, foi determinado a atividade catalítica de hidrólise da tanase imobilizada usando metodologia descrita no item 4.2.2.

4.2.4.2 - TEMPERATURA

Um aumento de temperatura geralmente corresponde a um aumento na taxa de reação por unidade de enzima. Entretanto, a elevação de temperatura e o tempo de exposição também podem promover o aumento na taxa de desativação térmica da enzima. A fim de avaliar a estabilidade térmica da tanase imobilizada, a mesma foi incubada a uma faixa de temperatura entre 30 e 60ºC em solução de tampão acetato 20 mM pH 5,0 durante 5 horas. A cada 30 minutos, até completar duas horas e depois de hora em hora ate completar 5 horas, foi determinada a atividade catalítica de hidrólise da tanase imobilizada usando metodologia descrita no item 4.2.2.

4.2.4.3 – OPERACIONAL

A fim de avaliar a estabilidade operacional da tanase imobilizada foram realizados reações de hidrólise do ácido tânico em regime de bateladas consecutivas com a reutilização da enzima imobilizada. O poder catalítico da tanase imobilizada foi determinado através da hidrolise do ácido tânico em solução de tampão acetato 20 mM, pH 5,0 à 30 e 50ºC com cada batelada durando 30 minutos. Foram realizadas 8 bateladas.

4.2.5 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA IMOBILIZAÇÃO SOBRE OS PARÂMETROS CINÉTICO DA ENZIMA

Para caracterização da tanase imobilizada foi determinada a taxa de reação em diferentes concentrações de substrato, a velocidade máxima (V_{max}) de reação e a constante de Michaelis-Mentes (K_m) para o substrato.

4.2.5.1 – DETERMINAÇÃO DA TAXA DE REAÇÃO (V_O)

Os parâmetros cinéticos das catalises enzimáticas são determinados tradicionalmente pelo uso da velocidade inicial (Vo), quando diferentes concentrações de um substrato são utilizadas. A taxa de reação foi determinada mantendo-se fixa a quantidade de enzima imobilizada em 50mg (0,2mg/ml de proteína) e variando a concentração de substrato, em tampão acetato 20mM, pH 5,0 a 30 e 50ºC. A atividade da enzima imobilizada foi determinada nas concentrações de 100 a 1000mg/L de acido tânico. Os dados obtidos para cada concentração foram representados graficamente, a partir destes, calculada a velocidade da reação (Vo) pela equação de regressão linear. Assim foi possível determinar o efeito do substrato na velocidade inicial da reação, podendo-se, então, calcular a velocidade máxima (V_{max}) da reação e a constante de Michaelis-Menten (K_m).

4.2.5.2 – DETERMINAÇÃO DE V_{MAX} E K_M

A partir dos valores de velocidade da reação e concentração de substrato (S), os coeficientes cinéticos, velocidade máxima (V_{max}) e constante de Michaelis-Menten

(K_m) foram calculados utilizando o método Lineweaver-Burk. A equação da reta foi determinada, sendo y = 1/Vo; x = 1/S; a declividade (a) = Km/Vmax; e o intercepto b = 1/Vmax.

4.2.6 – AVALIAÇÃO DO TEMPO DE VIDA ÚTIL DA ENZIMA IMOBILIZADA

O tempo de vida útil da tanase imobilizada foi avaliado por um período de 90 dias. Para isto foram realizados testes de medida do poder catalítico da tanase imobilizada nas suas melhores condições de atuação (pH 5,0/ 50ºC/30min de reação), como descrito no item 4.2.2, a cada 30 dias, sendo a mesma estocadas entre as analise a 10ºC em solução de tampão acetato 20mM pH 5,0.

4.2.7 – AVALIAÇÃO DA REUTILIZAÇÃO DO SUPORTE

Para que o uso dos componentes imobilizados torne o processo produtivo é necessário que estes sejam viáveis por um maior tempo possível e ainda que os suportes após a inativação do componente biológico possam ser reutilizados.Para avaliar a possibilidade de reutilização do suporte, as pérolas de vidro contendo a enzima já sem atividade catalítica foram lavadas com a água destilada e secadas a 100ºC por 12hs. Após este tratamento a mesma foi submetida a um novo processo de imobilização de acordo com o item 4.2.1. A capacidade de sua reutilização foi determinada avaliando a sua eficiência de imobilização, atividade do derivado e atividade recuperada de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.2.

4.2.8 – DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DE pH USANDO O TRANSDUTOR (ELETRODO DE pH) PELA AÇÃO DA ENZIMA TANASE LIVRE E IMOBILIZADA.

Para verificar a variação de pH na solução de ácido tânico pela ação da enzima tanase livre e imobilizada em pérolas de vidro, foram realizados testes estáticos com a enzima livre e imobilizada em contato com a solução de ácido tânico preparada com água destilada variando as concentrações de 10 a 100mg/L, na temperatura de 25ºC por 5 minutos para a tanase livre e 15 minutos para a tanase imobilizada. As variações de pH ocorridas foram registradas usando o eletrodo de pH marca *Actron* (transdutor).

A quantidade de enzima utilizada para os testes foram: 0,66 mg de proteína/mL (ou 0,679 U/ml) para a enzima tanase livre e de 0,26 mg de proteína por grama de suporte (ou 0,3243 U/g) para a enzima tanase imobilizada.

Nos ensaios realizados com a enzima tanase imobilizada, as soluções de ácido tânico foram testadas de forma crescente e decrescente em valores de concentração, e ainda, com e sem lavagem da enzima imobilizada com água destilada no volume de 300 mL durantes as medidas. A cada concentração testada a variação de pH (ΔpH) foi registrada através da leitura do sinal de saída do transdutor, ou seja, pela diferença entre o sinal de pH antes e após a reação enzimática.

4.2.9 – DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO COLORIMÉTRICA PELA AÇÃO DA ENZIMA TANASE IMOBILIZADA.

A fim de avaliar a possível utilização de um colorímetro com comprimento de onda fixo em 490 nm, como sistema de transdução junto com a tanase imobilizada, foram realizados ensaios com a enzima imobilizada em contato com a solução de ácido

tânico preparada com tampão acetato 20 mM pH 5,0 variando as concentrações de 50 a 500 mg/L, na temperatura de 50ºC por 15 minutos e o produto da reação determinado em *espectrofotómetro (DR 4000UV, HACH)* a 490.A quantidade de enzima tanase imobilizada utilizada foi de 0,26 mg de proteína por grama de suporte (ou 0,3243 U/g)

Os ensaios foram realizados, de forma que as soluções de ácido tânico fossem testadas de forma crescente e decrescente em valores de concentração do ácido tânico, e ainda com e sem lavagem da enzima imobilizada com água destilada no volume de 300 mL durantes as medidas. A cada nova concentração testada a variação da intensidade da cor resultante do produto obtido da reação enzimática foi determinada a 490 nm, em valores de delta de absorbância (ΔAbs), obtidos pela diferença entre as leituras da absorbância antes e após a reação enzimática.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados preliminares obtidos para o desenvolvimento do biossensor enzimático proposto estão apresentados no decorrer deste capítulo.

A escolha do componente biológico, baseado no elemento medido e a caracterização deste componente, bem como a imobilização, a determinação do tempo de vida do biocomponenete e a seleção do transdutor, foram alguns dos testes preliminares realizados.

Em todos os resultados apresentados a seguir foram obtidos em triplicata.

5.1- IMOBILIZAÇÃO DO *COMPONENTE BIOLÓGICO (ENZIMA TANASE) E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA UTILIZADA* SOB DIFERENTES ASPECTOS

Devido a sua natureza protéica, as enzimas são altamente sensíveis as variações de pH, temperatura, concentração de substrato, entre outros fatores. Portanto, o conhecimento da influência destes parâmetros sobre a reação enzimática permite explorar melhor as suas propriedades catalíticas.

Qualquer que seja o método de imobilização da enzima o que se deseja é preservar, tanto quanto possível, a atividade biocatalítica da mesma e a sua especificidade. Apesar da superioridade das enzimas imobilizadas sobre as livres em diversos aspectos, o processo de imobilização pode modificar a cinética e as propriedades físico-químicas da enzima, normalmente, reduzindo a sua atividade específica. As modificações das propriedades enzimáticas ocasionadas pelo processo de imobilização devem-se aos seguintes fatores (Gomes *et.al*, 2006): efeitos conformacionais – modificações conformacionais da molécula da enzima devido à alterações na sua estrutura terciária em função de alterações na estrutura terciária do sítio ativo; efeito estequereoquímicos - uma parte da molécula da enzima é imobilizada em uma posição tal que o sítio ativo é relativamente inacessível ao substrato; efeitos microambientais (efeitos de partição) – interações eletrostáticas entre o suporte e o substrato, neste caso, as condições do microambiente próximo à enzima são diferentes daqueles da solução reacional; e efeitos difusionais ou de transferência de massa – têm origem na resistência de difusão do substrato até o sítio catalítico da enzima, e do produto para a solução (Brigida, 2006;Gomes *et.al*, 2006; Rodrigues, *et al* 2008).

Para verificar as alterações causadas pelo processo de imobilização foram determinados as influências do pH e da temperatura na atividade da tanase imobilizada, bem como estimados os parâmetros cinéticos. Em quase todos os ensaios os efeitos ocasionados pelo processo de imobilização foram avaliados comparando os resultados obtidos com a tanase imobilizada e em solução (tanase livre).

5.1.1- Avaliação do Procedimento de Imobilização

A imobilização por ligação covalente é o resultado da reação de um grupamento funcional do suporte com um grupamento presente na enzima. Dependendo do grupamento disponível no suporte, a ligação pode ocorrer com os grupos aminas, hidroxilas e/ou tióis da enzima que irão influenciar na sua atividade quando imobilizada. O critério utilizado para avaliar o desempenho do método de imobilização do componente biológico selecionado foi descrito no item 4.2.2 e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.1 e na Tabela 5.1, bem como os valores da atividade da enzima tanase imobilizada (atividade do derivado), seu percentual de atividade recuperada, e o rendimento da imobilização.

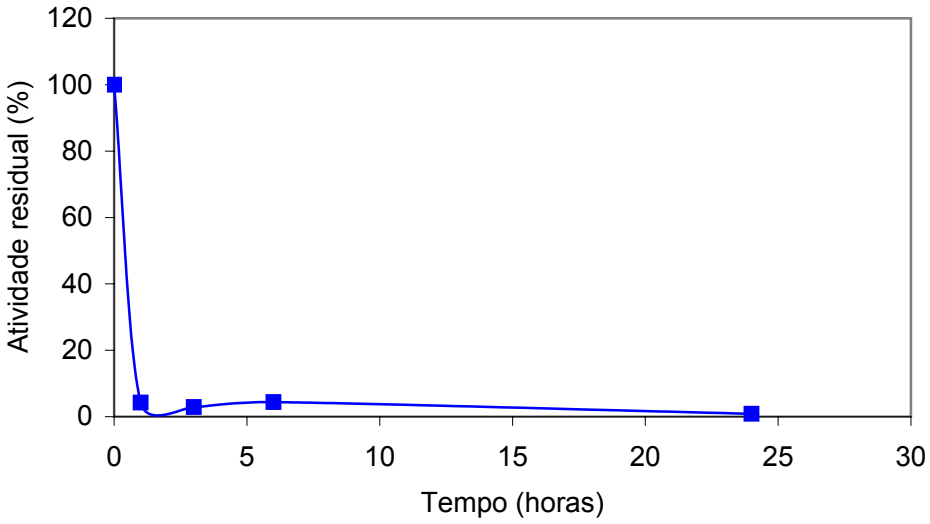


Figura 5.1: Atividade residual de tanase no sobrenadante ao longo do processo de imobilização

Tabela 5.1: Atividade da tanase imobilizada no suporte avaliado

Atividade	Pérola de vidro
Transferida do sobrenadante para o suporte (U/mL)	0,404
Rendimento de imobilização (%)	99
Derivado (U/g)	0,1636
Recuperada (%)	40,5

Assim, analisando a Figura 5.1 podemos verificar que houve uma rápida redução na atividade do sobrenadante, apresentando um rendimento de imobilização em torno de 99%. Porém, a partir de cálculos posteriores observou-se que apesar da alta redução da atividade da tanase no sobrenadante foi possível obter apenas 40,5% de atividade recuperada (Tabela 5.1), tal fato pode ser atribuído a problemas de limitações difusionais, como dificuldades do substrato em difundir até a matriz imobilizada, ou a resistência em liberar o produto para fora da matriz (Cabral *et al*, 2003, Gomes *et al* 2006).

Rodrigues *et al* (2008) observaram que dependendo do suporte utilizado, bem como dos grupamentos formados na superfície do suporte, ocorre uma diferença nos valores de atividade recuperada da enzima lipase em relação ao valor de rendimento de imobilização. Este fato corrobora os dados obtidos no presente estudo, onde obtem-se altos rendimentos de imobilização com menores valores de atividade recuperada.

5.1.2 – Avaliação do Tempo no Processo de Imobilização

Após formadas as primeiras ligações entre a enzima e o suporte, esta começa a perde flexibilidade e novas ligações se tornam mais difíceis de serem estabelecidas. Desta forma, o tempo de imobilização implicaria em mais ligações

formadas entre a enzima e o suporte e como conseqüência, uma diminuição da atividade enzimática devido à mudanças conformacionais tornando a estrutura da enzima mais rígida, como seria esperado. Porém, por outro lado, pode ocorrer também um aumento na estabilidade térmica e alcalina da enzima imobilizada em função do aumento do tempo de imobilização.

A fim de avaliar a influência do tempo do processo de imobilização no rendimento do mesmo, a atividade do derivado e a atividade recuperada, foram determinados realizando testes reduzindo o tempo de contato entre o suporte e a solução enzimática. Analisando a Tabela 5.2 constata-se que com a diminuição do tempo de imobilização foi possível obter um aumento no valor da atividade do derivado, embora a atividade recuperada não foi afetada.

Rodrigues *et al* (2008) avaliaram também a influência do tempo de imobilização sobre a atividade recuperada da lipase imobilizada e verificaram que quando a enzima lipase foi imobilizada em agarose e quitosana ocorreu uma diminuição da sua atividade após 24 h. Tal fato pode ser justificado pela possível ocorrência de mudanças conformacionais da enzima quando esta foi exposta a um tempo maior de imobilização.

Tabela 5.2: Efeito do tempo do processo de imobilização na atividade da enzima tanase imobilizada

Atividade	**Tempo de imobilização (horas)**	
	24	**5**
Rendimento de imobilização (%)	99	97,8
Derivado (U/g)	0,1636	0,2716
Recuperada (%)	40,5	43

5.1.3-Efeito do pH na Atividade da Enzima Tanase Livre e Imobilizada

Sabe-se que mudanças de pH provocam alterações no caráter iônico dos grupamentos aminos e carboxílicos das proteínas, afetando o sítio catalítico e a conformação da enzima. Tais mudanças conformacionais influenciam na interação enzima-substrato afetando a atividade enzimática, a taxa de reação máxima e a estabilidade da enzima. Diante de tais influências foi avaliado o efeito do pH no perfil de atividade e na estabilidade da tanase imobilizada em comparação com o efeito dos mesmo fator na tanase livre.

5.1.3.1-*Influência do pH no perfil de atividade da enzima tanase.*

Na figura 5.2 podemos observar o perfil de atividade da tanase imobilizada em pérolas de vidro em diferentes valores de pH do meio reacional e da tanase livre.

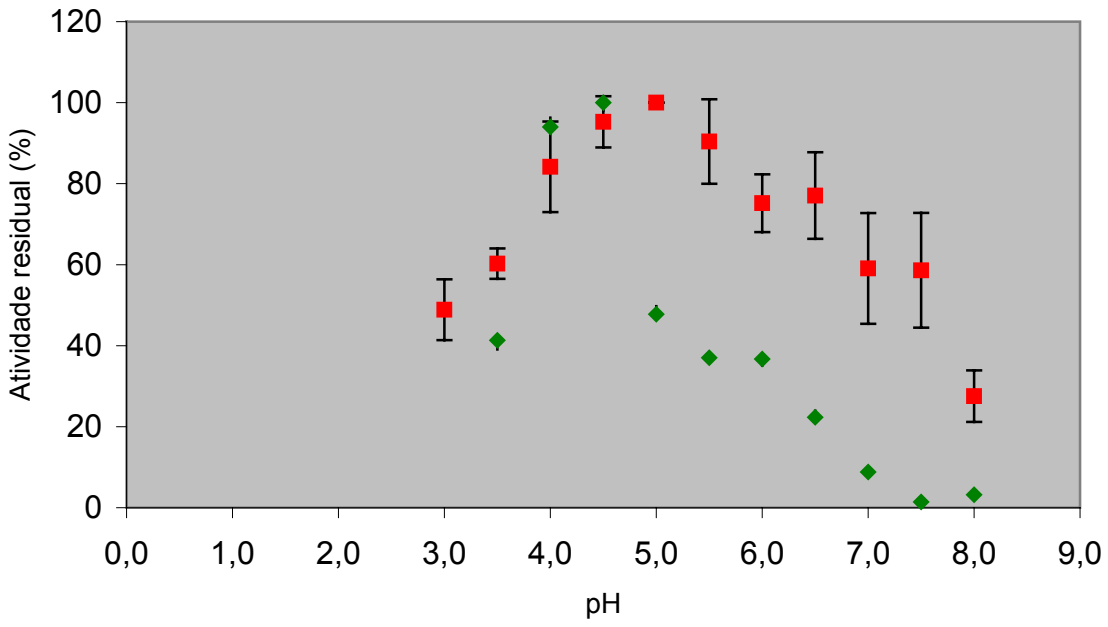


Figura 5.2: Perfil da atividade residual da tanase livre (♦) e imobilizada em pérolas de vidro (■) a diferentes valores de pH.

Normalmente, após sofrer o processo de imobilização o pH ótimo de atuação das enzimas tendem a se modificar, um dos motivos para que isso ocorra pode ser atribuido aos grupamentos hidroxilas (-OH) presentes na estrutura do suporte que possuem afinidade pelos hidrogênios ionizáveis (H^+) disponiveis no meio reacional, ocasionando um acúmulo desses íons, o que pode afetar o microambiente da enzima, e consequentemente, sua faixa de pH ótimo de atuação. Por outro lado, os grupos carboxílicos da enzima podem também influênciar no acúmulo de hidrogênios ionizáveis. A estabilidade deste microambiente ocorre em pH básico, permitindo maior redução da concentração de ions H^+ no sistema imobilizado deslocando, por essa razão, o valor de pH ótimo de atuação da enzima.

Na enzima tanase tal fato também foi observado, visto que o valor do pH ótimo da enzima após o processo de imobilização mudou de 4,5 para 5,0. Também foi observada uma melhora na atividade resídual da tanase em valores de pH acima do valor ótimo, ficando em torno de 60% para a tanase imobilizada em pH 7,0, enquanto que a livre apresentou 20% de atividade residual em pH 6,5 (Figura 5.2).

O deslocamento em direção a região alcalina também foi observado por Weetall e Detar (1974). Contudo, estes autores destacam que a enzima utilizada em seu estudo, já apresentava como particularidade um patamar ótimo de atividade da enzima livre que ocorria na faixa de pH entre 6,0 e 7,0, destoando do observado por outros autores, onde o ótimo acontecia em pH 5,0. Após imobilização o ótimo foi deslocado para 7,0 a 7,5. Já Abdel-Naby *et al*. (1999) observaram uma redução no valor de pH ótimo, de 5,5 para 4,5, enquanto Sharma *et al*. (2007) não observaram alteração no pH ótimo, permanecendo em 5,0.

Pundir *et al* (2008) também observaram um aumento no valor do pH ótimo da enzima oxalato oxidase após processo de imobilização, passando de 5,0 para 6,5, enquanto Pahujani *et al* (2008) observaram que o pH ótimo da lípase após sua imobilização imobilizada em Nylon-6 ativado com glutaraldeido deslocou para o lado ácido saindo de 8,5 para 7,5. Bayramoglu *et al* (2008) demonstraram que com o processo de imobilização o valor do pH ótimo da enzima cloroperoxidase, bem como o seu perfil de atividades não foi alterado.

5.1.3.2- ***Estabilidade da enzima tanase sob diferentes valores de pH.***

Como as enzimas são proteínas, mudanças de pH provocam alterações no caráter iônico dos grupamentos da enzima de forma a afetar a sua atividade catalítica, através de modificações causadas no sítio ativo e na estrutura conformacional. Tais mudanças conformacionais influenciam na estabilidade da enzima, de forma que efeitos puramente iônicos provocados por baixos ou altos valores de pH podem causar desnaturação considerável e conseqüentemente inativação enzimática (Mateo *et al*, 2007).

Testes foram realizados visando verificar a estabilidade da enzima tanase a diferentes valores de pH e observou-se que tanto a tanase livre quanto a imobilizada mostraram ter estabilidade na sua atividade hidrolítica na faixa de pH estudada (4,0-6,0) por 5 horas, mantendo a sua atividade residual em torno de 70% (± 4,56 %). Em pH 5,0 foi observado a melhor estabilidade da atividade para ambas, apresentando 92,24% (± 7,68%) de atividade residual para tanase imobilizada e de 88,25% (± 1,89%) para tanase livre após 5 horas de incubação (Figura 5.3).

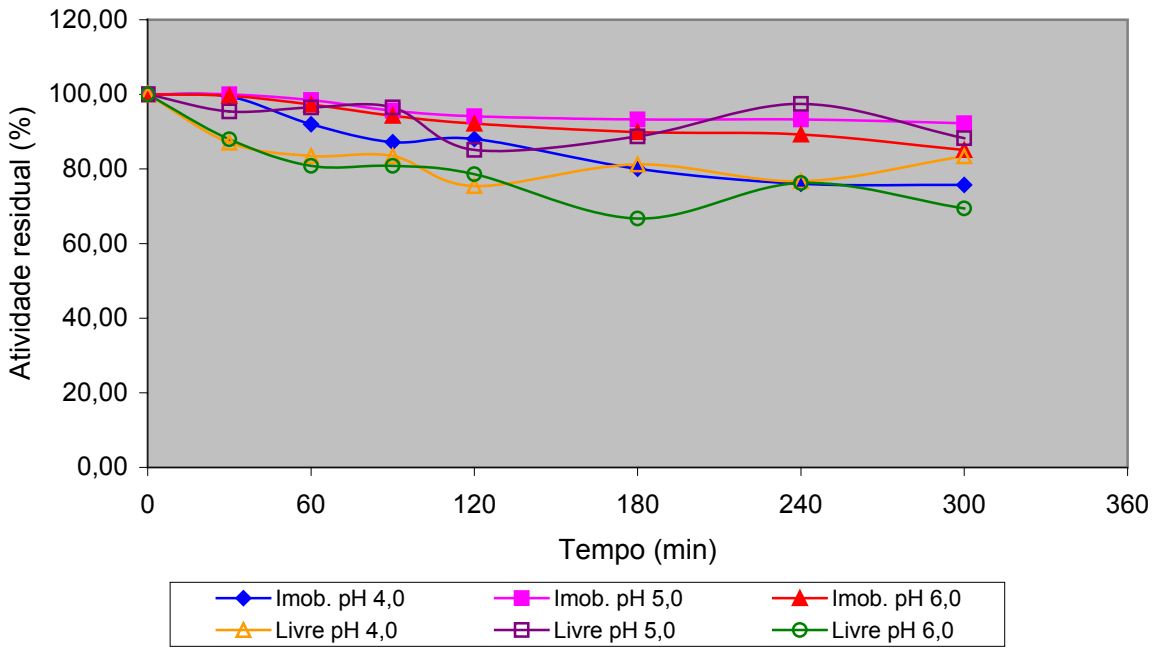


Figura 5.3: Estabilidade da tanase livre e imobilizada em pérola de vidro sob diferentes valores de pH .

5.1.4- Efeito da Temperatura na Atividade da Enzima Tanase Livre e Imobilizada.

A maioria das reações químicas se processam em uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. Um aumento na temperatura imprime maior energia cinética ás moléculas dos reagentes, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidades de tempo. As reações catalisadas por enzimas apresentam um comportamento semelhante as reações catalisadas quimicamente. Porém, as enzimas são moléculas protéicas complexas e sua atividade catalítica esta relacionada a necessidade de que sua estrutura terciária seja mantida principalmente por um grande número de ligações não covalentes, como ponte de hidrogênio, ligações dissulfetos e interações hidrofóbicas (Brigida, 2006). Se a molécula absorve excesso de energia, a estrutura terciária se rompe e a enzima

ficará desnaturada, perdendo sua atividade catalítica. À medida que a temperatura se eleva o aumento esperado na velocidade, resultante do aumento das colisões entre a enzima e o substrato, é contraposto pelo aumento da velocidade de desnaturação. Conseqüentemente, a curva de atividade-temperatura é o resultado líquido dos efeitos opostos resultantes da elevação da temperatura (aceleração da reação) e do aumento da inativação (desnaturação).

5.1.4.1- ***Influência da temperatura no perfil da atividade da tanase.***

A dependência da atividade da tanase imobilizada e livre em relação a temperatura foi investigada de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.3.2 e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.4.

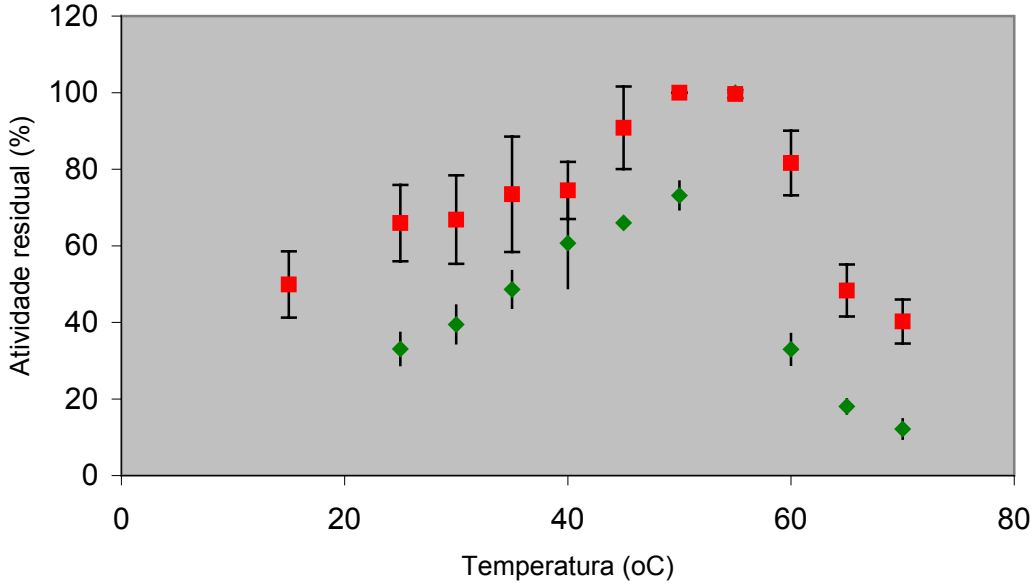


Figura 5.4: Perfil da atividade residual da tanase livre (♦) e imobilizada (■) a diferentes valores de temperatura.

Na faixa de temperatura estudada (25 a 70ºC) a tanase apresentou o seu máximo de atividade em torno de 50ºC para a enzima imobilizada, enquanto que para a enzima livre em torno de 55ºC (Figura 5.4) A temperatura de 25ºC foi possível observar que com o processo de imobilização ocorreu um aumento na atividade residual da tanase imobilizada, ficando em torno de 32%. A temperatura de 70ºC, a tanase livre apresentou uma atividade abaixo de 10%, contrastando com a enzima tanase imobilizada, que demonstrou uma retenção de 40% na sua atividade residual. Em temperaturas acima do ótimo de reação a tanase imobilizada mostrou ter uma melhor retenção de sua atividade.

Abdel-Naby *et al*.(1999) em seus estudos observaram que com o processo de imobilização houve um aumento no valor de temperatura ótima passando de 40º C para 55ºC, fato inverso ao alcançado em nosso estudo em que o valor da temperatura ótima diminuiu com a imobilização. Contudo, Sharma *et al* (2007) avaliaram a influência da temperatura na atividade da tanase de *Penicillum variable* bruta, purificada e imobilizada e demonstraram que não houve alteração no valor da temperatura ótima, apresentando o máximo de atividade em torno de 50ºC. Tais diferenças nos resultados podem ser justificadas novamente, pelas diferenças conformacionais que cada enzima pode possuir devido a sua fonte de origem, bem como, pela matriz e técnica de imobilização utilizada (Fukui, 1975)

5.1.4.2- ***Estabilidade térmica da enzima tanase.***

A Figura 5.5 apresenta a variação da atividade da tanase livre e imobilizada após tratamento térmico de 30 a 60°C por 5 horas realizado de acordo com a procedimento descrito no item 4.2.4.2. É possível verificar que a 30°C ambas, enzimas livre e imobilizada, apresentaram uma retenção de atividade em torna de 95% e 100% após 1 hora, respectivamente. Após 5 horas a enzima livre apresentou 88% de atividade residual em relação a sua atividade resídual inicial e a imobilizada 92%. Em contra partida a 60°C a tanase livre, após 1 hora de incubação apresentou 19% da sua atividade inicial, enquanto que, a imobilizada manteve 40% da sua atividade inicial. Já a 50°C, que foi o valor de temperatura ótimo encontrado para a tanase imobilizada, após 1 hora de incubação a enzima imobilizada manteve a sua atividade residual em torno de 88% (± 2,57%) e de 64% (± 1,87%) após 5 horas em relação a atividade inicial.

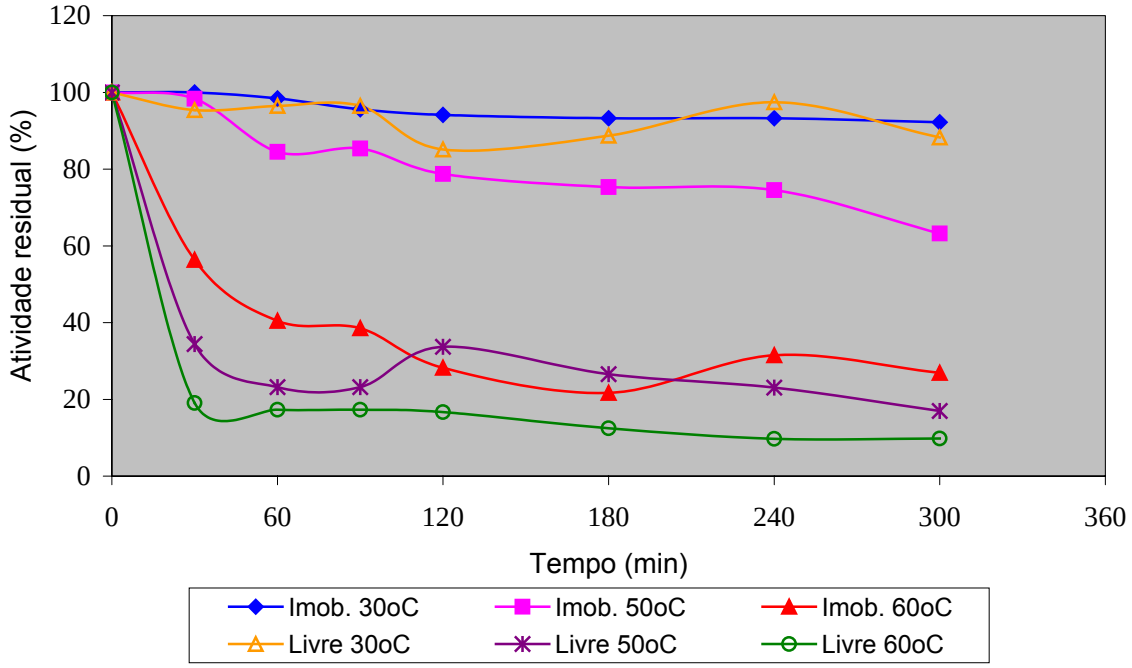


Figura 5. 5: Estabilidade térmica da tanase livre e imobilizada e imobilizada.

Esta melhora na estabilidade com a enzima imobilizada também foi observada por Abdel-Naby *et al*. (1999) e Sharma (2007) quando relataram que a estabilidade térmica a 50ºC após uma hora e 24 horas de experimento manteve a sua capacidade catalítica em torno de 85%.

Godjevargova *et al* (2006) observaram que a estabilidade térmica da enzima glicose oxidase foi consideravelmente melhorada com o processo de imobilização, de forma que após 5 horas de incubação a 60ºC a enzima apresentou 78% da sua atividade residual enquanto que na forma livre após 1 hora sua atividade catalítica foi totalmente perdida.

5.1.5- Determinação dos Parâmetros Cinéticos da Tanase Imobilizada

Os valores obtidos de atividade da tanase imobilizada para cada concentração de ácido tânico usada nas duas temperaturas avaliadas de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.5 estão apresentados na Figura 5.6.

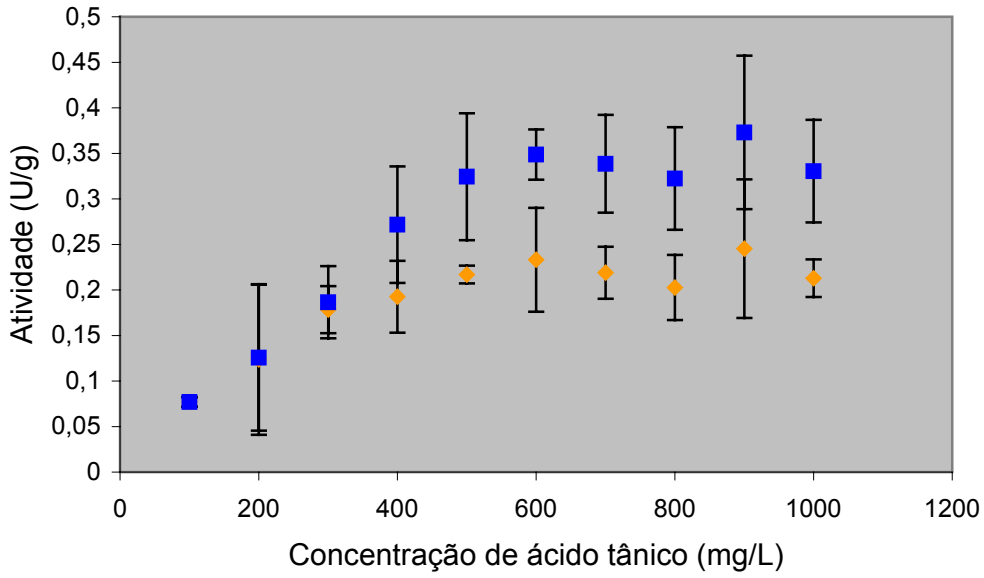


Figura 5.6: Atividade da tanase imobilizada em função da concentração de ácido tânico nas temperaturas de reação de 30ºC (♦) e 50ºC (■).

Observa-se que a atividade da tanase imobilizada aumentou linearmente até a concentração de 300 mg/L, iniciando-se a partir dessa concentração uma diminuição na taxa de reação até a concentração de 500 mg/L, acima da qual a taxa de reação tente a se estabilizar, sugerindo assim que a atividade da tanase imobilizada para ambas as temperaturas avaliadas (30ºC e 50ºC) em função da concentração de ácido tânico segue cinética do tipo Michaelis-Menten.

Os valores de Km e Vmax (Tabela 5.3) foram calculados pelo método de Linewearver-Burk, em que foi plotado o gráfico 1/[S] versus 1/Vo tanto para tanase livre como para a tanase imobilizada. O valor mais elevado de Km determinado para tanase imobilizada indica que mediante imobilização, a afinidade da tanase pelo substrato foi reduzida. Esse comportamento se deve á menor transferência de massa do meio reacional para o sistema imobilizado, pois o processo da

imobilização reduz a difusão do substrato nos interstícios do suporte (Mateo *et. al*, 2007). Este fato também foi observado por Bayramoglu et al (2008) e Tukel e Alptekin *et al* (2004) quando observaram que os valores de Km das enzimas cloroperoxidase e catalase, respectivamente foram aumentados após o processo imobilização por ligação covalente.

Tabela 5.3: Parâmetros cinéticos da tanase livre e imobilizada.

Parâmetros	Temperatura		
	Livre	Imobilizada	
	30ºC	30ºC	50ºC
Equação da reta	y = 0,1175x + 0,0037	y = 994,9x + 2,9107	y = 1186x + 1,2963
R^2	0,9894	0,9800	0,9816
Vmax (U/mg proteína)	3,465	1,259	2,967
Km (mg)	317,00	348,81	914,88
Vmax/Km	$85,1 \times 10^{4}$	$10,2 \times 10^{-4}$	$8,43 \times 10^{-4}$

Este é um perfil típico dos sistemas imobilizados, tento em vista que a enzima livre exerce sua atividade catalítica em um meio homogêneo, enquanto a enzima imobilizada em um suporte sólido deve agir em um meio heterogêneo. Desta forma o decréscimo da atividade das enzimas imobilizadas pode ser normalmente atribuída as mudanças conformacionais na sua estrutura terciária ou aos impedimentos estéricos que resultam na dificuldade de acesso do substrato ao seu sitio ativo (Bayramoglu *et. al*, 2008; Mateo *et. al*, 2007).

5.1.5- Determinação do Tempo de Vida útil da Tanase imobilizada.

Um parâmetro importante que deve ser considerado quando se quer desenvolver um biossensor enzimático é o tempo de vida útil, durabilidade e estabilidade ás condições de estocagem da enzima em questão (Shanet *et al* 2007; Salgado, 2001).

Normalmente as enzimas imobilizadas mantêm sua atividade em condições de estocagem quando não são expostas a condições adversas de pH e temperatura (Gomes *et al*, 2006). A determinação da atividade da tanase livre e imobilizada durante o processo de armazenamento (10ºC em ph 5,0)pode ser observado na Figura 5.7. Foi verificado que após 90 dias de estocagem a atividade hidrolítica da tanase imobilizada manteve-se estável, apresentando ainda valores de atividade residual em torno de 94%. Desta forma quando comparada a tanase livre pode-se observar que o procedimento de imobilização não afetou a atividade hidrolítica da enzima.

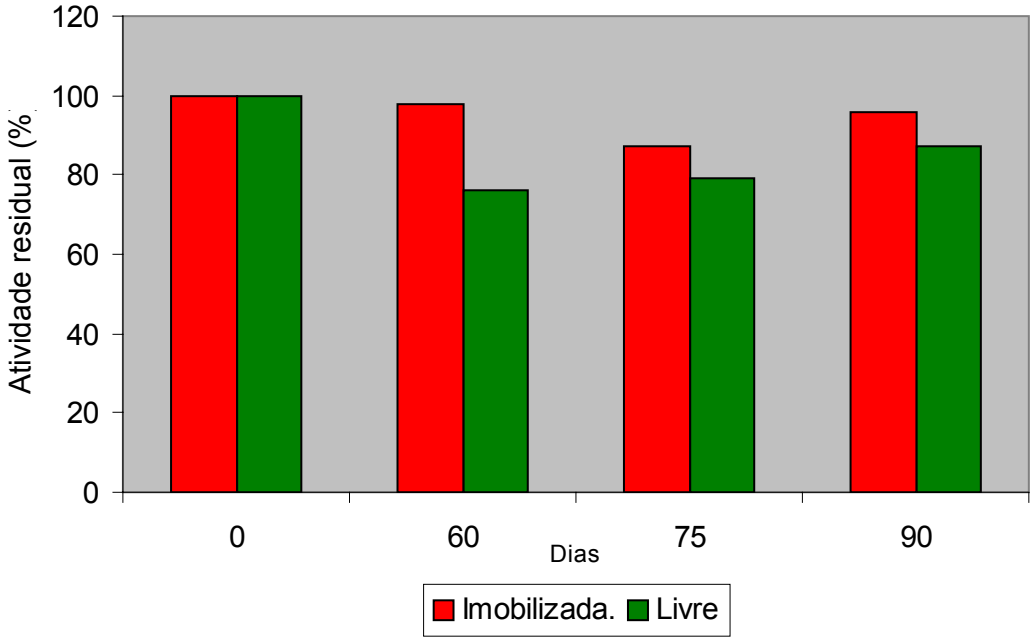


Figura 5.7: Avaliação do tempo de vida útil da tanase livre e imobilizada em pérolas de vidro.

Sharma *et al* (2007) estudaram o tempo de vida útil da tanase de P. *variable* livre e liofilizada armazenadas a 4ºC e 30ºC por um período de um ano, os resultados mostraram que após 15 dias de armazenamento a atividade se manteve em 90%, com 120 dias apresentou uma retenção de 70% da sua atividade resídual e esta permaneceu até um ano durante sua estocagem para ambos os tipos avaliados.

5.1.6- Determinação da Estabilidade Operacional da Tanase Imobilizada

Estudos de estabilidade operacional podem mostrar a robustez do processo de imobilização através do reuso de uma mesma enzima imobilizada em vários ciclos reacionais consecutivos (Rosatto *et al*. 2001). A estabilidade operacional da tanase imobilizada em pérola de vidro foi testada em reações de hidrólise do ácido tânico nas temperaturas de 30°C e 50°C por 30 min. A atividade catalítica da enzima foi calculada ao final de cada ciclo, tomando por base a concentração de acido gálico formado a partir da hidrólise do ácido tânico por grama de enzima imobilizada. Assim foi possível verificar que após 8 repetições a atividade catalítica do derivado imobilizado a 30ºC diminuiu 30% (± 3,57 %) enquanto que a 50ºC sofreu uma redução de 20% (± 1,63 %) em relação a primeira repetição (Figuras 5.8a e 5.8b).

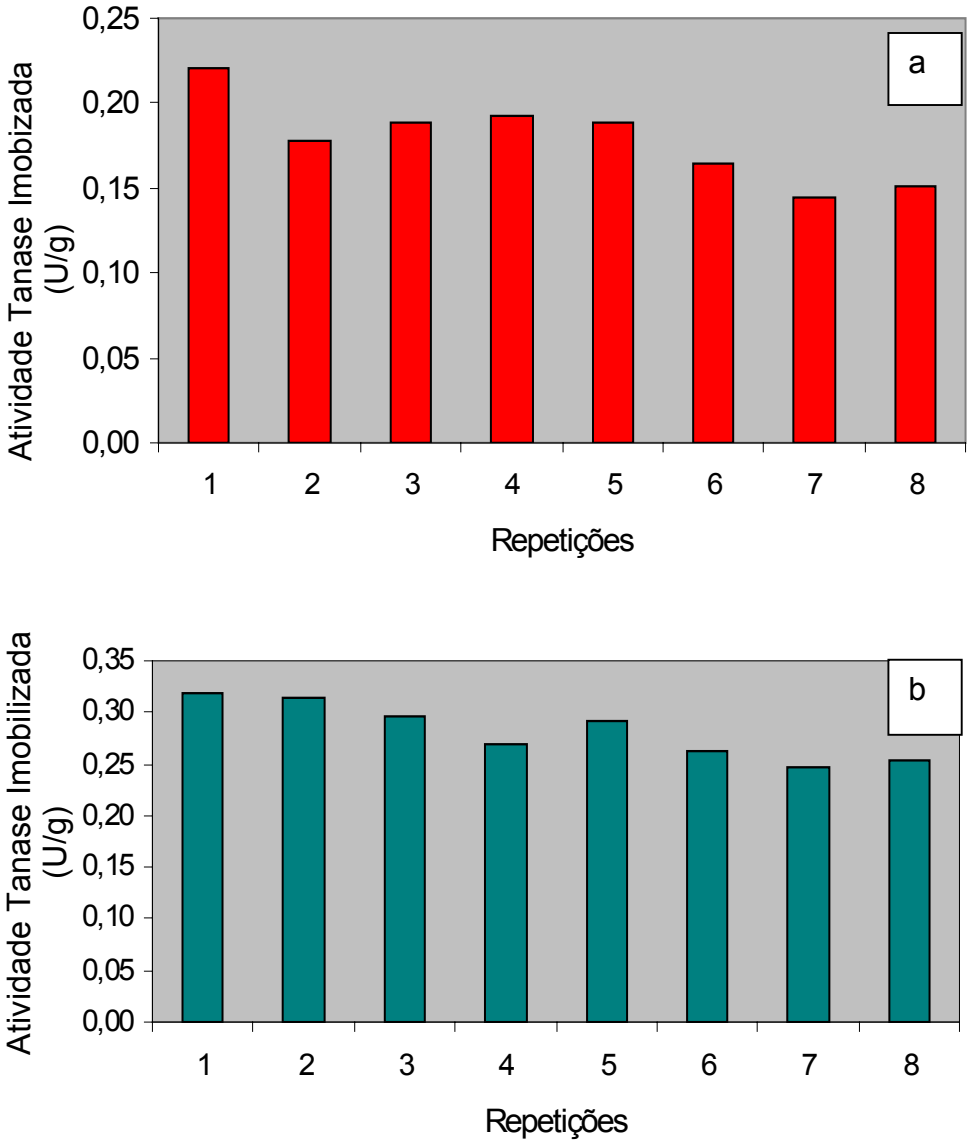


Figura 5.8: Estabilidade operacional da tanase imobilizada em pérolas de vidro a 30ºC (a) e 50ºC (b).

Abdel-Naby *et al*.(1999) após imobilizar tanase em quitosana observaram que a enzima era capaz de manter o seu alto poder de hidrólise após 17 repetições de uso da mesma, apresentando apenas um perda de 15% da sua capacidade catalítica. Pahujani *et al* (2008) observaram que lipase imobilizada em Nylon-6 após

8 repetições de sua reação de hidrólise, apresentava 85% de sua atividade resídual e após 13 repetições 20%.

Porém no caso do objetivo futuro deste estudo a utilização da tanase imobilizada na construção de um biossensor enzimático, a queda de 20% da atividade não compromete o reuso do mesmo lote, já que novas calibrações do instrumento podem ser refeitas adaptando o novo valor, de forma que o mesmo lote poderá ser utilizado mais de oito vezes, o que irá diminuir o custo do instrumento.

5.1.7- Estudos de Reutilização do Suporte para o Processo de Imobilização

Para que o uso dos componentes imobilizados torne o processo de construção do futuro sensor viável é necessário que estes se mantenham ativos por um maior tempo possível, e ainda que os suportes após inativação do componente biológico possam ser reutilizados (Shanet *et al* 2007, Salgado 2001; Romani *et al,* 2000) pois o custo econômico do suporte é bem expressivo de forma a encarecer bastante o valor final de tal instrumento. Com isso testes foram realizados para avaliar a eficiência do método de imobilização com o uso do suporte reutilizado.

As pérolas de vidros contendo a enzima já sem atividade catalítica foram lavadas com água destilada e secas a 100ºC. Após este tratamento foram submetidas a um novo processo de imobilização. A cada novo processo realizado foi determinado o rendimento de imobilização, atividade da enzima imobilizada e atividade recuperada para avaliar a eficiência da reutilização do suporte. Este mesmo procedimento foi seguido antes de cada reutilização do suporte

Assim, de acordo com os dados apresentados na Tabela 5.4 podemos verificar que até a terceira reutilização foi possível obter um rendimento em torno de 93%, a partir da quarta reutilização o rendimento caiu, ficando em torno 68%. Porém ao se analisar os valores de atividade do derivado e atividade recuperada podemos verificar que os resultados obtidos na quarta e quinta reutilizações foram maiores do que o da primeira utilização do suporte. Esse aumento pode ter ocorrido devido à obtenção de novas formas estruturais da enzima imobilizada de forma que favoreça um melhor acesso do substrato ao sítio ativo, bem como a melhor liberação do produto para o macroambiente. Salgado *et al* (1997) ao utilizadar pérolas de vidro para imobilização de enzimas observaram que com a reutilização do suporte ocorreu uma queda de 30% no rendimento de imobilização quando comparadas ao valor obtido com a pérola nova.

Com isto pode-se concluir que a reutilização dos suportes é possível o que garante maior economia na fabricação do biossensor, já que sempre que o biocomponente perde totalmente sua eficiência é necessária sua substituição.

Tabela 5.4: Rendimento da imobilização e determinação das atividades com a reutilização do suporte.

Atividade	Reutilização				
	1º	**2º**	**3º**	**4º**	**5º**
Rendimento de imobilização (%)	99	92,2	95,2	74,9	61,6
Derivado (U/g)	0,1636	0,1594	0,1342	0,3243	0,3029
Recuperada (%)	40	26,3	20	63,7	65,9

5.2- TESTES COM TRANDUTORES

Baseado no produto da reação enzimática da enzima tanase sobre o substrato (ácido tânico), citada no item 3.3.2.1, foi realizada a seleção do transdutor a ser utilizado visando a construção futura de um biossensor enzimático para taninos hidrolisáveis. Esta seleção busca a utilização de um transdutor que fosse de fácil implementação e o mais versátil possível, para que a concentração de taninos presente no meio analisado pudesse ser determinada sem grandes dificuldades operacionais durante o seu uso, e a construção do biossensor futuramente seja viável.

Na seleção inicial do transdutor foi escolhido o sistema eletrodo de pH com pHmetro. Este eletrodo mede a diferença de potencial entre duas superfícies que variam de acordo com o pH da solução, na qual estão imersos. Para verificar se o eletrodo respondia as variações de pH da solução de ácido tânico pela ação da

enzima foram realizadas primeiramente testes estáticos com a enzima livre em contato com as soluções de substrato (ácido tânico) preparadas com água destilada nas concentrações de 10 a 100 mg/L, na temperatura de 25ºC por um tempo de reação de 5 minutos. A partir da Figura 5.9 é possível observar que até uma concentração de 50mg/L de ácido tânico foi possível obter uma linearidade na resposta da variação do pH em relação a atividade da enzima em função da formação do produto (ácido gálico).

Desta forma seria possível o uso deste sistema como medida do produto da reação enzimática, nas condições testadas para concentrações de substrato na faixa de 10 a 50 mg/L.

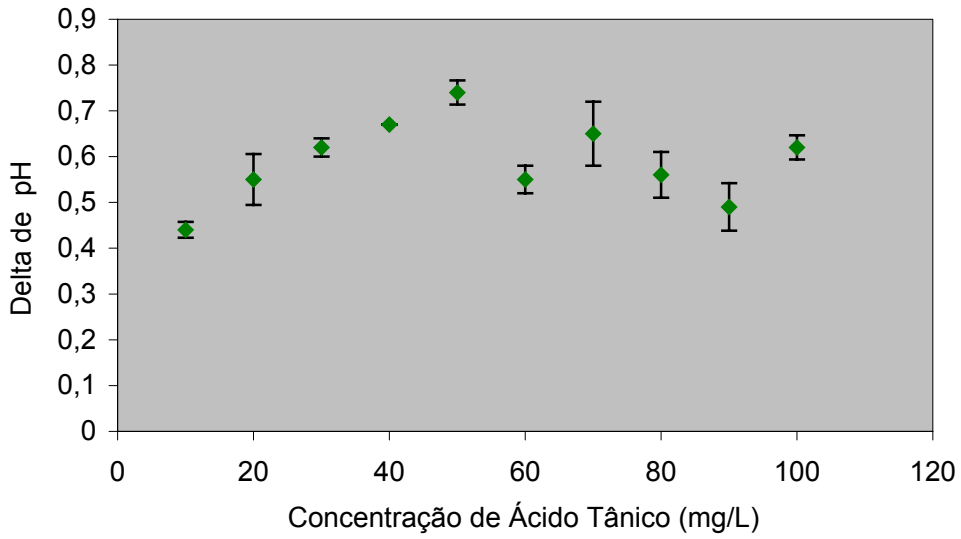


Figura 5.9: Curva de resposta para o transdutor (eletrodo de pH) a partir de reações da enzima tanase livre

Além do caráter linear da medida outra característica avaliada foi a estabilidade de resposta do eletrodo com relação ao tempo da reação enzimática. Assim, foram realizados testes sucessivos com soluções de ácido tânico com a mesma concentração (200mg/l) e com a mesma quantidade de solução enzimática

(0,1 mL) a 25ºC variando o tempo de reação. Os resultados obtidos apresentados na Figura 5.10 revelaram que com 5; 10 e 15 min de reação enzimática o eletrodo de pH demonstrou ter uma estabilidade, ou seja, foram obtidos desvios de 2%; 0%, e 3% respectivamente, mostrando que o eletrodo de pH pode ser utilizado para detecção do sinal da resposta biológica da reação enzimática da tanase quando esta é utilizada na sua forma livre.

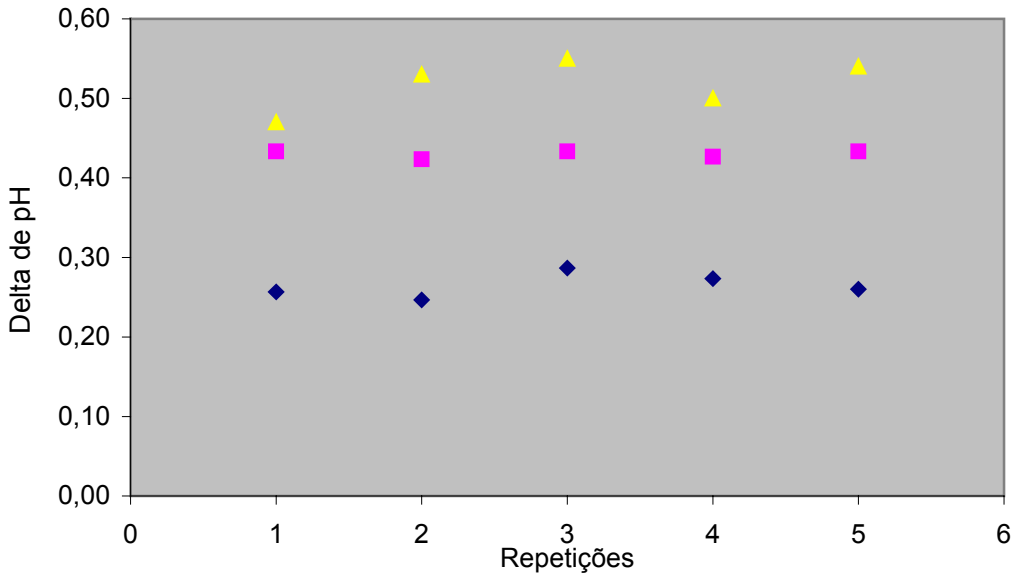


Figura 5.10: Avaliação da estabilidade de resposta do eletrodo com o tempo de reação (♦) 5 min (■) 10 min (▲) 15 min.

Após os testes com a enzima livre para verificar as características de respostas do eletrodo de pH em relação as mudanças que ocorrem no meio em função das reações enzimáticas, foram realizados ensaios com a enzima imobilizada em pérolas de vidro a fim de verificar se também nesta condição a resposta se mantinha estável. Para a IUPAC (Union of Pure Apllied Chemistry , 2001) só é

considerado um biossensor aquele instrumento que apresenta na sua construção o componente biológico em contato diretamente com elemento transdutor, e para atender tal característica é necessário que este componente biológico esteja imobilizado na sua superfície ou próximo ao mesmo (Thevenot *et al*, 2001).

Inicialmente foi realizada a construção da curva de resposta para o sistema eletrodo de pH e a enzima imobilizada testada. A curva de resposta de um instrumento é extremamente importante pois esta garante a sua precisão e confiabilidade. Em geral a maior parte dos sensores analíticos ou analisadores industriais comercialmente disponíveis necessitam ser testados e calibrados antes da sua utilização, pois se por qualquer motivo ocorrer qualquer alteração nas suas condições padrões de operação isto poderia acarretar em erros de medição.

Estes testes simulam uma calibração do mesmo e podem ser realizados facilmente através de experimentos sob as condições padrões que variam para cada instrumento. Curvas então podem ser traçadas usando um conjunto de pontos experimentais obtidos observando o sinal de saída do instrumento (eletrodo de pH) para um determinado valor do sinal de entrada (concentração de acido tânico). Estas curvas são chamadas de curvas de calibração e através delas pode-se obter a faixa linear e o grau de linearidade do instrumento. Saber se um instrumento é ou não linear é indispensável, pois instrumentos não lineares não possuem relação direta da leitura do sinal de saída com o da entrada. Desta forma para estes instrumentos é necessário obter uma função de calibração e a partir dela relacionar valores de saída e entrada.

Para a determinação das curvas de resposta ou de calibração para o futuro biossensor enzimático, testes foram realizados usando soluções de ácido tânico na

mesma faixa de concentração utilizada nos ensaios para a tanase livre (10 a 100 mg/L); sendo estas testadas de forma crescente e decrescente em valores de concentração, e ainda com e sem lavagem da enzima imobilizada durante as medidas; sendo a variação de pH obtida para cada concentração testada.

As curvas de resposta ou calibração para o biossensor enzimático podem se observadas na Figura 5.11

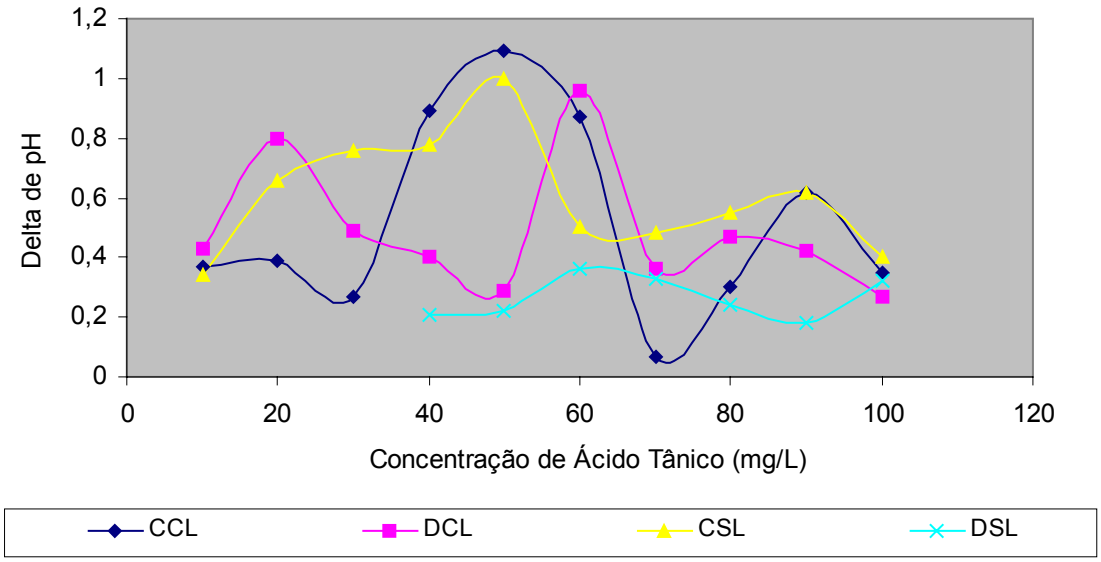


Figura 5.11: Curva de resposta ou calibração para o sistema transdutor (eletrodo de pH) e a enzima imobilizada usando soluções de diferentes concentrações de ácido tânico com e sem lavagem entre as medidas. CCL = crescente com lavagem; CSL = crescente sem lavagem; DCL = decrescente com lavagem; DSL = decrescente sem lavagem.

Através das curvas obtidas foi possível verificar que não existe uma resposta linear, bem como uma estabilidade e repetibilidade dos dados obtidos em todas as

formas testadas, de forma que não seria possível utilizar o eletrodo de pH como transdutor do biossensor.

Porém antes de rejeitar a possibilidade de utilização do eletrodo de pH como transdutor devido aos resultados não satisfatórios obtidos foram feitos novos testes para verificar se tal falta de linearidade e repetibilidade de resposta do sistema não seria causado pelo desconhecimento em relação ao tempo ideal de resposta para a enzima imobilizada, pois caso o tempo usado fosse maior que o necessário para a medida em cada concentração, saturações do sistema (enzima imobilizada) ou da própria membrana do eletrodo poderiam ocorrer dificultando assim as medidas.

Desta forma foi verificado o tempo de resposta do eletrodo com relação à ação da enzima imobilizada. O tempo de resposta é uma característica dinâmica de um instrumento e pode ser definido como o tempo que a leitura deste instrumento leva para ir de um valor inicial a valor final de equilíbrio na leitura. Geralmente instrumentos comerciais têm esta variável, tempo de resposta, como uma variável especificada. No caso dos biossensores o tempo de resposta em geral é maior que o de outros instrumentos, já que leva-se em conta o tempo que a amostra permanece em contato com o componente biológico.

Para determinar o tempo de resposta do eletrodo de pH utilizado em relação a enzima imobilizada, testes foram realizados variando a concentração da solução de ácido tânico de 10 a 50mg/L em ordem crescente de concentração e sem lavagem do eletrodo e da enzima. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 5.12a, 5.12b, e 5.12c.

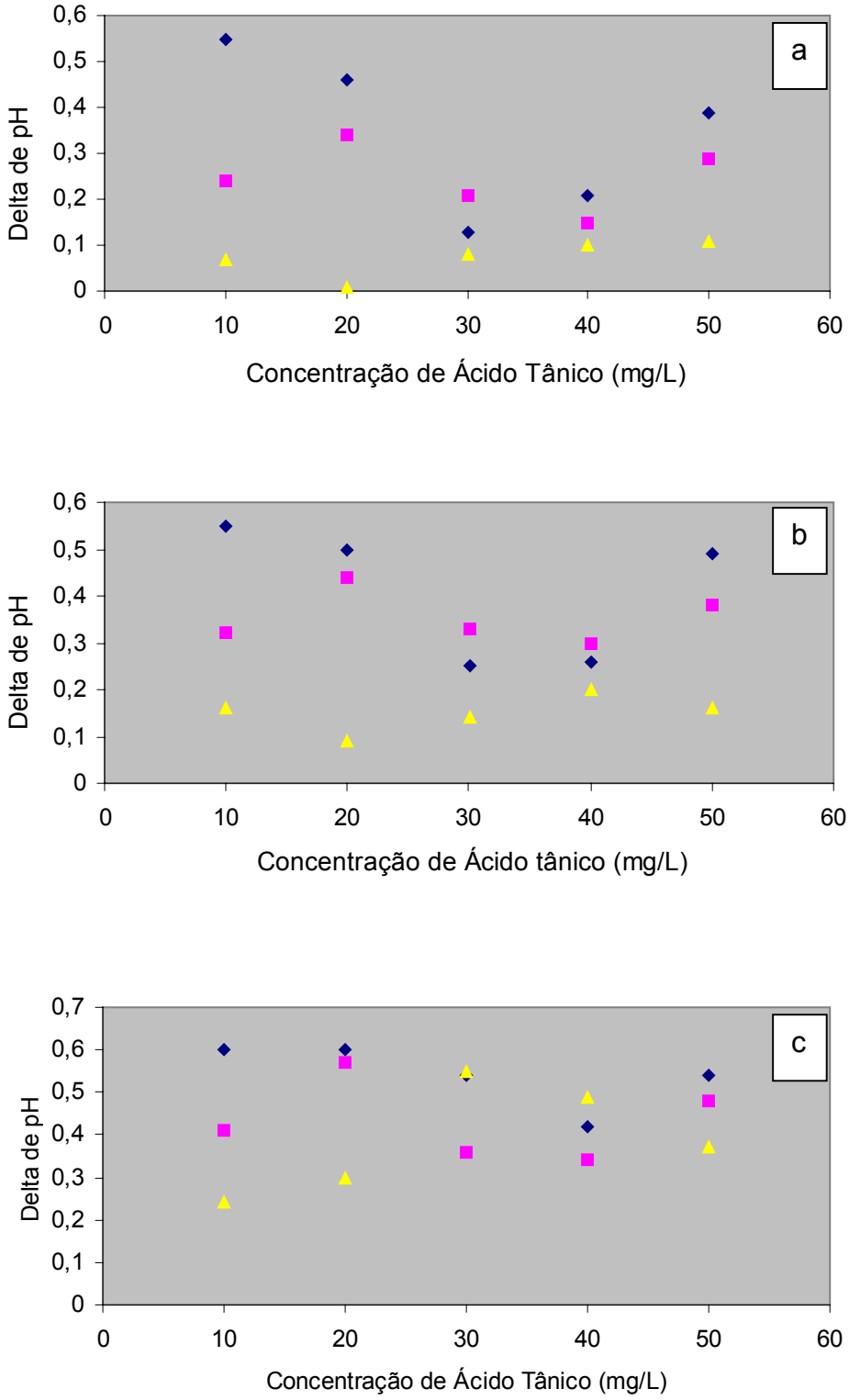


Figura 5.12: Avaliação do tempo de reação na resposta do sistema eletrodo de pH + enzima tanase imobilizada em pérolas de vidro. (a) 5 minutos, (b) 10 minutos e (c) 15 minutos.

Assim podemos constatar que, independente do tempo de resposta utilizado a falta de repetibilidade, estabilidade e linearidade continua, demonstrando que o sistema eletrodo de pH usando a enzima tanase imobilizada em pérolas de vidro não é adequado para ser utilizado como transdutor do biossensor.

Em seguida em função dos resultados insatisfatórios obtidos com o sistema de transdução inicial, um novo transdutor foi testado usando como base outro produto da reação , citada nos itens 3.3.2.1 e 4.2.1 , um complexo colorido capaz de ser detectado oticamente a 490nm.

Desta forma, visando o uso de um colorímetro na construção do biossensor de taninos, tendo este comprimento de onda fixo em 490 nm (disponível no laboratório de sensores biológicos do DEB/EQ), testes foram realizados para avaliar este novo sistema de transdução. A construção da curva de resposta para o sistema transdutor (colorimetro + enzima tanase imobilizada) para diferentes soluções de ácido tânico com e sem lavagem entre as medidas é mostrada na Figura 5.13. Neste teste foi fixado o tempo de reação de 15 minutos em variações crescentes da concentração de substrato (50 a 500 mg/L), e as medidas foram realizadas em deltas de absorbância, ou seja, diferenças entre o valor da absorbância da solução do substrato puro e da absorbância da solução originária da reação enzimática.

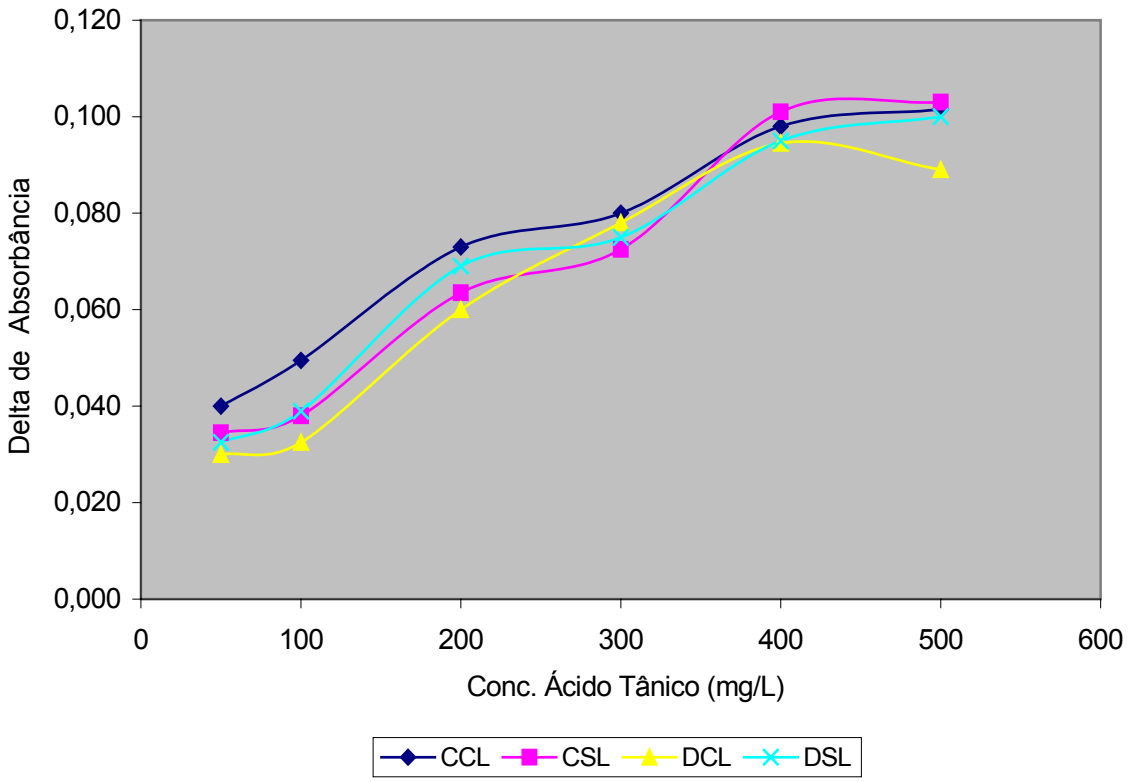


Figura 5.13: Curva de resposta ou calibração para o sistema transdutor (colorímetro) + enzima tanase imobilizada usando soluções de diferentes concentrações de ácido tânico com e sem lavagem entre as medidas. CCL = crescente com lavagem; CSL = crescente sem lavagem; DCL = decrescente com lavagem; DSL = decrescente sem lavagem

Ao analisar a linearidade das curvas apresentadas na Figura 5.13 pode-se observar que a curva obtida usando o sistema colorímetro mais tanase imobilizada em analise crescente de concentração d ácido tânico e sem lavagem entre as medidas foi a que apresentou maior linearidade, com coeficiente de correlação de R^2 = 0,9633. No entanto ao observarmos as linearidade de todas as curvas obtidas (Tabela 5.5) independente das condições dos testes, todas apresentaram coeficiente

de correlação superior a 0,9 o que indica uma boa linearidade do sistema testado, portanto sua elevada sensibilidade.

Tabela 5.5: Equação da reta das curvas obtidas pelo sistema colorímetro + tanase imobilizada

Condições dos Testes	Equação da Reta	R^2
Crescente com Lavagem	Y = 0,0001x + 0,0375	0,9562
Crescente sem Lavagem	Y = 0,002x + 0,0258	0,9633
Decrescente com Lavagem	Y = 0,0002x + 0,0245	0,9078
Decrescente sem Lavagem	Y = 0,0002 + 0,028	0,9520

Desta forma podemos concluir que na construção do biossensor enzimático para taninos o sistema detector colorimétrico a 490 nm mais enzima tanase imobilizada em pérola de vidro podem ser usadas e aplicadas para a quantificação do ácido tânico na concentração de 50 a 500 mg/L, na temperatura de 50ºC, pH 5,0 e com 15 minutos de reação.

Cabe ressaltar que qualquer variação nestas condições poderá afetar o funcionamento do sistema e conseqüentemente do biossensor a ser construído.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante a realização deste trabalho permitem obter varias conclusões que são descritas a seguir:

✓ A técnica de imobilização usada permitiu uma boa eficiência na imobilização, cerca de 99% mantendo o poder catalítico das enzimas imobilizadas por cerca de 90 dias quando estocadas em tampão fosfato pH 5,0 a 10ºC. O método também permitiu que pérolas reutilizadas, pérolas com enzimas já sem atividade catalíticas e pré-tratadas com lavagem com água destilada e secagem a 100ºC, fossem usadas como suporte de imobilização embora ocorressem quedas em torno de 20% de atividade recuperada e após a quarta reutilização ocorra um aumento na atividade recuperada.

✓ As melhores condições de atuações da enzima tanase imobilizada foram: pH ótimo de atuação 5,0 e temperatura ótima de atuação entre 50ºC e 55ºC

✓ A faixa de concentração de acido tânico suportada pela enzima imobilizada foi de 100 a 500 mg/L de ácido tânico mostrando até 500 mg/L de ácido tânico aumento linear de sua atividade. Apresentando valores da constante de Michaelis-Menten para ambas as temperaturas avaliadas, 30ºC e 50ºC superiores ao valor da enzima livre.

✓ O tempo de 5 horas para o processo de imobilização foi suficiente para que o sistema pérola de vidro e enzima tanase atinjisse o equilíbrio.

✓ Dentro da faixa de valores de pH (4,0 – 6,0) estudados a enzima tanase imobilizada se mostrou estável por o tempo de 5 horas, apresentado melhor estabilidade em pH 5,0 (92,24%).

✓ A tanase imobilizada apresentou ter estabilidade térmica, mostrando valores de atividade residual após 5 horas de incubação de 92,24%; 63,23% e 26,92% para as temperaturas de 30ºC; 50ºC e 60ºC respectivamente.

✓ Os estudos de estabilidade operacional mostram que a tanase imobilizada após 8 ciclos de reutilização em regime de batelada apresentou uma queda de 30% e 20% no valor de sua atividade residual em relação a primeira utilização nas temperaturas de 30ºC e 50ºC respectivamente.

✓ O sistema eletrodo de pH mais enzima tanase imobilizada em pérolas de vidro não se mostrou adequado para ser utilizado como sistema de transdução, nas condições testadas. Em contra partida o sistema colorímetro (490nm) mais enzima tanase imobilizada apresentou em todas das curvas obtidas nos ensaios realizados coeficientes de correlação superiores a 0,9 de forma que se mostrou apto

para ser utilizado como sistema de transdução para a construção do futuro biossensor.

6.2 – SUGESTÕES

Através do estudo de imobilização da enzima tanase e de suas características foi possível constatar a sua possibilidade de ser utilizada no desenvolvimento do biossensor para taninos hidrolisáveis, porem ainda existem muitos pontos a serem explorado para a obtenção de tal instrumento, entre ele podem citar:

- Otimização do processo de imobilização, de forma a avaliar quais seriam as melhores condições para o técnica de imobilização utilizada, como quantidade de enzima fornecida ao suporte, tempo de imobilização, pH do meio de imobilização.

- Verificar a utilização de outros sistemas de transdução para ser utilizado como detector da reação enzimática.

- Construção do biossensor enzimático para taninos hidrolisáveis e testa-los em amostras reais, tais como chás, sucos e vinhos.

- Aplicar o biossensor em uma linha de fluxo de forma a automatizar de maneira simples a técnica analítica desenvolvida.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Naby, M.A., Sherif, A.A., El-Tanash, A.B., Mankarios, A.T., (1999). Immobilization of Aspergillus oryzae tannase and properties of the immobilized enzyme. *J. Appl. Microbiol*, v. 87, p. 108–114; 1999.

Aerts, T.J.; Barry, T.N.; Mcnabb, W.C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosytems and Environment*. V.75, p.1-12, 1999.

Aguilar, C.N. Guitiérrez-Sánchez, G. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acly hydrolase. *Food Sci. Tech. Int*, v. 5, p. 373-382, 2001.

Alfaya, A.A. S.; Kubota, L.T. A. Utilização de materiais pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Química Nova*, v.25, n 5, v. 835-841; 2008.

Arya, S.K.; Datta, M.; Malhotra, B.D. Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 23, p.1083–1100, 2008.

Bailey, J. E.; Ollis, D. F. *Biochemical Engineerring Fundamentals*. 2. ed. New Yourk: McGrawl-Hill; 1986

Barahona, R; Sanchez, S; Lascano, C. E.; Emyr Owenc; Phillip Morris; Theodorou, M.K., Effect of condensed tannins from tropical legumes on the activity of fibrolytic enzymes from the rumen fungus *Neocallimastyx hurleyensis, Enzyme and Microbial Technology*, v. 39 p. 281–288; 2006

Bate-Smith, E.C. Astringent tannins of *Acer* species. *Phytochemistry*, v.16, p. 1421-1426, 1977.

Bayramoglu, G.; Senem, K.; Yilmaz, M.; Toppare, L.; Arica, M. Y.; Covalent immobilization of chloroperoxidase onto magnetic beads: Catalytic properties and stability, *Biochemical Engineerring Journal*, v. 38, p.180-188; 2008.

Boadi, D.K.; Neufeld, R.J.; Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28 p. 590–595; 2001

Brigida, A.I.S. Estudo da imobilização de lipase tipo B de Candida antartica utilizando fibra da casca de coco de verde como suporte, *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará

Cabral, J.M.S.; Aires-Barros, M.R.; Gama, M. *Engenharia enzimatica*, Lidel, 2003.

Campanella, L. Nuccilli, A.; Tomassetti, M.; Vecchio,S. Biosensor analysis for the kinetic study of polyphenols deterioration during the forced thermal oxidation of extra-virgin olive oil. *Talanta*, v.74 v.1287–1298, 2008.

Chang, F., Chen,P.; Chen, R.L.C.; Lu,F.; Cheng, T.; Real-time assay of immobilized tannase with a stopped-flow conductometric device *Bioelectrochemistry*, v. 69 p.113–116; 2006.

Chibata, I. Industrial application of immobilized enzyme-systems. *Pure and Applied Chemistry*. v. 50, n. 7, p. 667-675. 1978.

Chibata, I.; Tosa, T. Immobilisation enzymes and immobilized microbial-cells. *Journal of Synthetic Organic Chemistry* Japan. v. 36, n. 11, p. 917-930; 1978.

D'Souza, S. F.; Godbole, S. S. Immobilization of invertese on rice husk using polyethylenimime, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 52, p. 59-62, 2002.

Du,P.; Zhou,B.; Cai, C. 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, p. 149–156; 2008.

Fernández-Lorente, G.; Fernández-Lafuente, R.; Palomo, J.M.; Mateo, C.; Bastida, A.; Coca, J.; Haramboure, T.; Hernández-Justiz, O.; Terreni, M. Guisán, J. M. Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of hydrolysis catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 649-656; 2001

Ferwerda,J.G.; Siderius, W.; Van Wieren, S.E.; Grant,C.C.; Peel, M.; Skidmore, A. K.; Prins, H.H.T.; Parent material and fire as principle drivers of foliage quality in woody plants, *Forest Ecology and Management*; 2006

Folly, R.O.M.; Valdman, B.; Valero,F.; Salá.; Potentiometric Sensor for On-line Glucose Determination, *Biotechnology Techniques*, 10(11), p. 867-870; 1996.

Giorno, L.; Drioli, E.; Biocatalytic membrane reactor: applications and perspectives. *Tibtech*, v. 18, p. 339-349; 2000.

Godjevargova, T.; Nenkova, R.; Konsulov, V.; Immobilization of glucose oxidase by acrylonitrile copolymer coated silica supports, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 38, p. 59-64; 2006.

Hall, E.A.H.; Amperometric Biosensor; Biosensor, *Open University Press*, Londom, p. 351; 1990.

Haslam, E. Vegetal tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, v. 68, p. 2713-2721, 2007

Haslam, E., Lilley, T.H. Natural astringency in foodstuffs – a molecular interpretation. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nut*. 27 (1): 1-40. 1988.

Haslam, E. Stangroom, J.E. The esterase and depsidase activities of tanase, *Biochem. J.*, v. 99 p. 28-31; 1966

Hernández-Jústiz, O.; Fernadez-Lafuente, R.; Terreni, M. E Guisan, J.M. Use of aqueous two-phase systems for in situ extration of water soluble antibiotics during their synthesis by enzymes immobilized on porous supports. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 59, n 1, p. 73-79; 1998.

Huang,W.; Ni, J.; Borthwick, A. G.L.; Biosynthesis of valonia tannin hydrolase and hydrolysis of valonia tannin to ellagic acid by *Aspergillus SHL* 6, *Process Biochemistry*, v. 40 p.1245–1249; 2005.

Inoue, K.H., Hagerman, A.E. Determination of gallotannin with rhodanine. *Analytical Biochemistry*, v. 169, p. 363-369; 1988

Kar, B.; Banerjee, R.; Bhattacharyya, B. C.; Effect of additives on the behavioural properties of tannin acylhydrolase, *Process Biochemistry*, v. 38 p. 1285-1293, 2003.

Kennedy, J. F.; White, C. A.; Melo, E. H. M. The immobilization of enzymes and cells. *Chimicaoggo*, p. 21-29; 1988.

Lehninger, A.L. *Princípios de bioquímica*. ed. 5 São Paulo: Sarvier, 1989. Cap. 9.

Leka P.K.; Lonsane, B.K. Production application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv. Appl. Microbiol*. v. 44 p. 215-260, 1997

Makkar, H. P. S.; Becker, K. Do tannins in leaves os tree and shubs from African and Himalayan regions differ in leves and activity? *Agrof. Systems*, v. 40, p. 59-68, 1998;

Mateo, C; Abian, O. Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Increase in conformational stability of encimes immobilized on epoxy-activated supports by favoring aditional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, v.26, p. 509-515; 2000.

Mello,L.D; Kubota, L.T. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. *Talanta*, v. 72, p. 335–348; 2007.

Melo, A.F; Pinto, G.A.S.; Gonçalves, L.R.B; Ferreira, A.L. Método para determinação da atividade de tanase em derivados imobilizados (2005). *Comunicado técnico* 1679-6535.

Melo, A. F.; Pinto, G. A. S.; Gonçalves, L.R.B; Ferreira, A L.O. (2005) Imobilização da tanase em suporte vítreos utilizando ϒ-aminopropiltrietoxilano (ATPS). *Comunicado técnico* 1679-6535.

Mueller-Harvey, I. Analsis of hydrolysable tannins. *Animal feed science and technology*, v. 91, p. 3-20, 2001.

Pahujani, S.; Kanwar, S.S.; Chauhan, G.; Gupta, R.; Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability, *Bioresource Technology*, v. 99, p. 2566-2570; 2008.

Pansera, M.R.; Santos, A.C.A.; Paese, K.; Wasum, R.; Rossato, M.; Rota, L.D.; Pauletti, G.F.; Serafini, L.A. Análise de taninos totais em plantas aromaticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13, p. 17-22; 2003

Perez, E.F. Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para oxalate. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2000.

Pinto, G.A.S.; Couri, S.; Leite, S.G.F.; Brito, E.S. Tanase: conceito, produção e aplicação. *B.Ceppa*, v.23, p. 435-462, 2005

Pinto, G.A.S.; Couri, S.; Gonçalves, E.B. Replacement of methanol by ethanol on gallic acid determination by rhodanine and its impacts on the tannase assay. *EJEAFChe*, ISSN: 1579-4377, 2006

Poncet-Legrand C, Edelmannb, A.; Putauxc,J.L; Cartaladea, D.; Sarni-Manchadoa, P.; Vernheta, A. Poly(L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids*, v. 20, p. 687–697, 2006

Pundir, C. S.; Chauham, N.S.; Bhambi, M.; Activation of polyvinyl chloride sheet surface for covalent immobilization of oxalate oxidase and its evaluation as inert support in urinary oxalate determination, *Analytical Biochemistry*, v.374, p. 272-277; 2008.

Rodrigues, D.S.; Mendes, A A.; Adriano, W.S.; Gonçalves, L.R.B.; Giordano, R.L.C.; Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 51, p. 100-109; 2008.

Romani, A.; Minunni, M.; Mulinacci, N.; Pinelli,P.; Vincieri, F.F. Comparison among differential pulse voltammetry, amperometric bisensor, and HPLC/DAD analysis for polyphenol determination. *J. Agric. Food Chem*, v.48, p. 1197-1203, 2000.

Rosatto, S.S. Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e silica modificada. *Tese de Doutorado Universidade* Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2000.

Sasakia, E.; Shimadab,T.; Osawaa,R.; Nishitania, Y.; Spring, S.; Lang, E.; Isolation of tannin-degrading bacteria isolated from feces of the Japanese large wood mouse, Apodemus speciosus, feeding on tannin-rich acorns, *Systematic and Applied Microbiology*, v. 28 p.358–365; 2005

Santos, S.A; Abreu, L.R.; Chagas, S.J.R. Efeito do armazenamento nos teores de fenólicos em caules de abacaxeiro. *Rev. Bras.Agroc*., v. 3 p. 107-109, 1997

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.

Sharma, S.; Agarwal, L.; Saxena, R. K. Purification, immobilization and characterization of tannase from Penicillium variable. *Bioresouce Technology*. Abril 2007.

Spink, C.; Wadso, I.; Methods Biochem. Anal, 23, p1; 1976.

Thevenot, D.R.; Toth, K.; Durst, R.A; Wilson, G.S.; Electrochemical biosensor: recommended definition and classification, *Biosensor & Bioelectronics*, v. 16, p. 121-131; 2001.

Thies, M.; Fischer, R. Photometric bestimmug von gallassäuredurch farbreaktion mit rhodanine. *Mikrochimica Acta*, v. 5, p.809-814, 1973.

Tischer, W.; Kasche, V. Immobilized enzymes: crystal or carriers? *Trends in Biotechnology*, v. 17, p. 326-335. 1999.

Tukel, S.S.; Alpetekin, O.; Immobilization and Kinetics of catalase ontomagnesium silicate, *Process Biochemistry*, v. 39, p. 2149-2155; 2004.

Vaquero I.; Marcobal, A.; Munoz, R.; Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine, *International Journal of Food Microbiology*, v. 96 p.199–204; 2004.

Weetall, H. H. e C. C. Detar (1974), Immobilization tannase. *Biotechonology and bioengineering*, v. XVI, p. 1095-1102; 1974.

Willis, R. B.; Allen, P. R., 1998. Improved method for measuring hydrolysable tannins using potassium iodate. *Analyst*, v. 123, p. 435-439.

Wilson, T.C., Hagerman, A.E. Quantitative determination of ellagic acid. *J. Agric. Food Chem*., v.38, p. 1678-1683. 1990.

Yesiloglu, Y. Utilization of bentonite as a support material for immobilization of Candida rugosa lipase. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2155-2159, 2005.

Yu, X.; Li, Y.; Wu, D.; Enzymatic synthesis of gallic acid esters using microencapsulated tannase: effect of organic solvents and enzyme specificity, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30 p.69–73; 2004.

Zhae, Y.B.; Wen, M.L.; Liu, S.Q.; Liu, Z.H.; Zhang, W.D.; Yao, Y.; Wang, C.Y.; Microbiologi Sensor for determination of Tannic Acid, *Microchemical J*., v. 60, p. 201-209; 1998.

Zanin, G. M. Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidade imobilizada. *Tese de Doutorado* em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ANEXOS

Anexo 01:

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA TANASE EM SOLUÇÃO

5,0 mL de solução 0,02% de ácido tânico

↓ Aclimatar em banho termostático

Adicionar 0,25 mL do complexo enzimático

↓ Incubar a 30ºC por 10 min

Transferir 0,4 mL da mistura reacional para tubos contento 0,6 mL de solução etanólica de rodanina 0,667%

↓ Homogeneizar e deixar em repouso por 5 min

Adicionar 0,4 mL de solução de KOH 0,5N

↓ Homogeneizar e deixar em repouso por 2,5 min

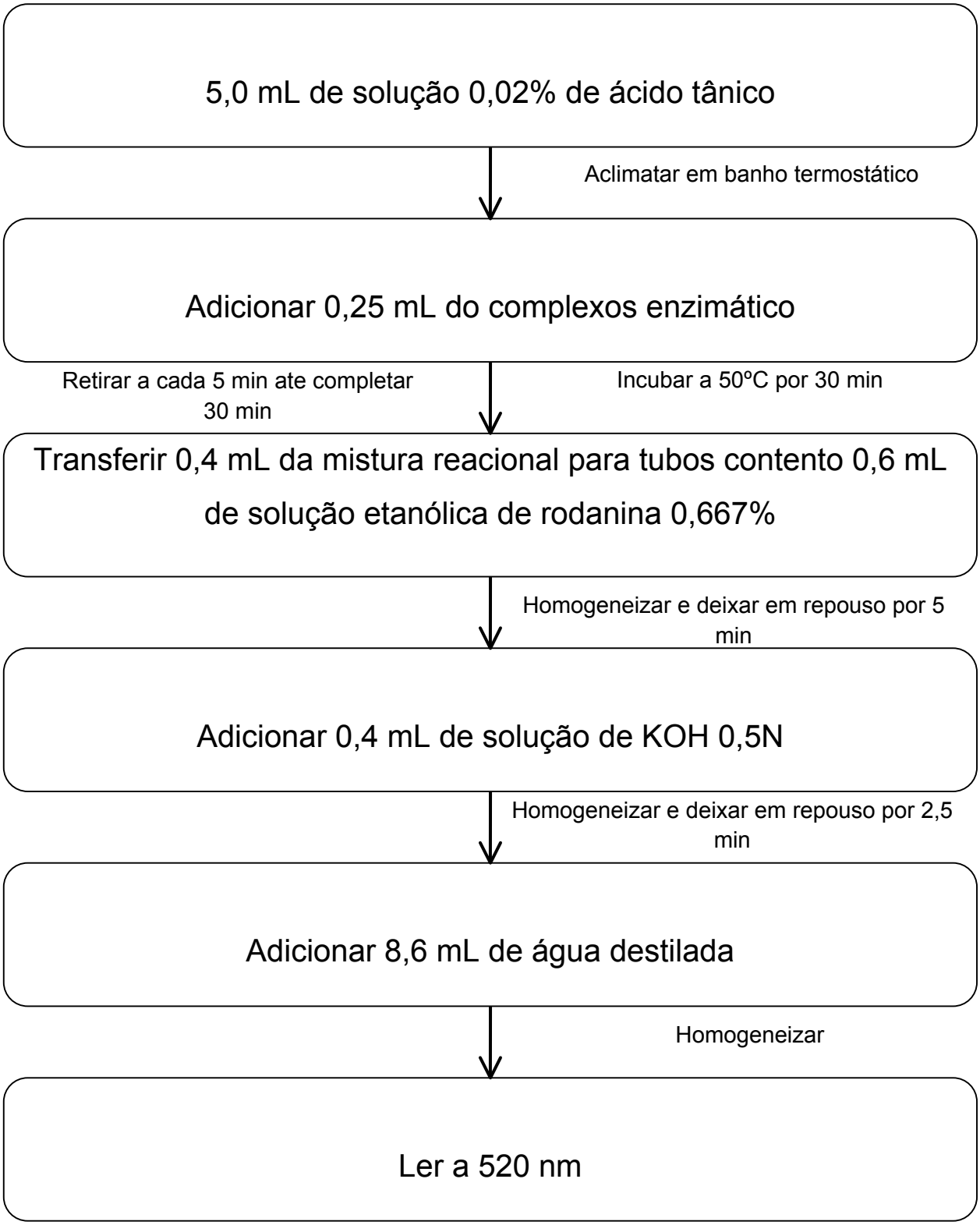
Adicionar 8,6 mL de água destilada

↓ Homogeneizar

Ler a 520 nm

Anexo 02:

SEQUENCIA DE ANALISE DO BRANCO UTILIZADO NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA TANASE EM SOLUÇÃO



Anexo 03:

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA TANASE IMOBILIZADA

10,0 mL de solução 0,05% de ácido tânico

↓ Aclimatar em banho termostático

Adicionar 0,25 mL do complexo enzimático

↓ Transferir imediatamente

Transferir 0,4 mL da mistura reacional para tubos contento 0,6 mL de solução etanólica de rodanina 0,667%

↓ Homogeneizar e deixar em repouso por 5 min

Adicionar 0,4 mL de solução de KOH 0,5N

↓ Homogeneizar e deixar em repouso por 2,5 min

Adicionar 8,6 mL de água destilada

↓ Homogeneizar

Ler a 520 nm