UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

VÂNIA PAULA SALVIANO DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE ÁCIDO BENZÓICO EM REFRESCOS A BASE DE GUARANÁ

RIO DE JANEIRO
2016

Vânia Paula Salviano dos Santos

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE ÁCIDO BENZÓICO EM REFRESCOS A BASE DE GUARANÁ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadores: Prof.ª. Drª. Andréa Medeiros Salgado
Prof.ª. Drª. Karen Signori Pereira
Prof. Dr. Alexandre Guedes Torres

Rio de Janeiro
2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vânia Paula Salviano dos Santos

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE ÁCIDO BENZÓICO EM REFRESCOS A BASE DE GUARANÁ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em:

Orientador (es):

Andréa Medeiros Salgado D.Sc., EQ/UFRJ

Karen Signori Pereira D.Sc., EQ/UFRJ

Alexandre Guedes Torres D.Sc., IQ/UFRJ

Luciana Maria Ramirez Ésper D.Sc., FF/UFF

Gisele dos Santos Costa D.Sc., SME/PCRJ

Emerson Schwingel Ribeiro D.Sc., IQ/UFRJ

Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto D.Sc., EQ/UFRJ

Amaro Barreto Gomes Jr. D.Sc., EQ/UFRJ

Dedicado a meus pais, Elson e Clarice e meu esposo, Adán, pelo incentivo e apoio incondicionais em todos os momentos

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo Adán, que esteve comigo em todos os momentos e não mediu esforços para que mais esse objetivo fosse alcançado.

Aos meus pais e irmãos pelo amor, incentivo, apoio.

Aos meus orientadores Profª. Andréa, Profª. Karen e Prof. Alexandre, pela orientação, pela atenção, aprendizado e a oportunidade de ter realizado este trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Sensores Biológicos pelo apoio, troca de experiências e idéias e pelos momentos de descontração.

Aos laboratórios da Escola de Química, E-103, E- 127 e LADEBIO e do Instituto de Química, LAABBM e LBNA pela utilização dos equipamentos e pela solicitude e atenção de seus integrantes.

Aos membros da banca examinadora, por participarem da avaliação deste trabalho e pelas suas importantes contribuições.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Meu profundo agradecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

CIP - Catalogação na Publicação

SS194d

Salviano dos Santos, Vänia Paula
DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE ÁCIDO BENZÓICO EM REFRESCOS A BASE DE GUARANÁ / Vänia Paula Salviano dos Santos. -- Rio de Janeiro, 2016.
136 f.

Orientadora: Andréa Medeiros Salgado.
Coorientadora: Karen Signori Pereira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Coordenação dos Programas de Pós Graduação em Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2016.

1. biossensor. 2. enzimas. 3. alimentos. I. Medeiros Salgado, Andréa, orient. II. Signori Pereira, Karen, coorient. III. Título.

RESUMO

Santos, Vânia Paula Salviano dos, **Desenvolvimento de um biossensor para detecção de ácido benzóico em refrescos a base de guaraná**. Rio de janeiro 2016. Tese de Doutorado do Programa de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Os sais do ácido benzóico, os benzoatos, estão dentre os conservantes de maior aplicação na indústria alimentícia, principalmente em bebidas não alcoólicas e alimentos de baixo pH. Pesquisas reportadas na literatura, relatam casos de reações adversas aos benzoatos, mesmo abaixo nos níveis estabelecidos por agências reguladoras, além de estarem relacionados à potencial formação de benzeno em bebidas, quando na presença do antioxidante ácido ascórbico. Diante do exposto, verifica-se a importância do monitoramento dos níveis de benzoato como conservante, não excedam o limite previsto pela legislação que no Brasil é de 0,05 g/100 mL, para bebidas não alcoólicas. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é método oficial de análise de benzoatos em alimentos, mas embora seja um método estabelecido, a CLAE apresenta algumas limitações tais como, complexidade, custo e o requerimento de operadores altamente treinados. Nesse sentido, os biossensores podem oferecer algumas vantagens, como baixo custo relativo, rapidez, portabilidade, fácil manuseio e etapas menos complexas de tratamento das amostras. Esse trabalho tem por objetivo a aplicação da enzima do extrato do macro fungo *Agaricus bisporus* como componente biológico na construção de um biossensor eletroquímico tendo como transdutor um eletrodo de oxigênio, para a detecção de benzoatos em amostras de bebidas não alcoólicas a base de guaraná. Para obtenção da tirosinase foram testados métodos químicos de rompimento celular, com (permeabilização com etanol, acetona e Triton X-100) e físico com N_2 líquido, seguida da concentração e purificação parcial com acetona e sulfato de amônio. A tirosinase da extração com acetona, concentrada com sulfato de amônio, foi imobilizada em suportes de quitosana, vidro, alginato de sódio e nylon. A imobilização em membrana de nylon 6,6 foi otimizada por meio de um planejamento fatorial 2^3 seguido do tratamento com borohidreto de sódio. As enzimas livre e imobilizada foram caracterizadas em relação a atividade enzimática (U/mL), estabilidade operacional e de estocagem, pH, temperatura, concentração de substrato e determinados os parâmetros cinéticos (k_m e v_m). A enzima imobilizada em membrana de nylon 6,6 por meio de ligação covalente com 1.5% de glutaraldeído seguida da reticulação com glutaraldeído 1.5% pH 6 sem redução com borohidreto de sódio, resultante da otimização, foi aplicada na construção das

curvas padrões com 5 concentrações de benzoato de sódio (0.01, 0.02, 0.05, 0.07, 0.09 g/100 mL) variando-se as concentrações de substrato (0.4 mM, 0.6mM e 0.8mM de L-tirosina em tampão fosfato de sódio 0.1M pH 6 a 25ºC). O tempo reacional foi fixado em 6 minutos, a concentração de substrato L-tirosina foi de 0.8 mM para construção da curva padrão A faixa linear foi de 0.01 g/100 mL a 0.07 g/100 mL de benzoato de sódio. O biossensor foi aplicado em amostras comerciais de refrescos a base de guaraná, mas os resultados não foram condizentes com os resultados das análises por CLAE, apresentando percentuais de erro relativo acima de 10%.

ABSTRACT

Santos, Vânia Paula Salviano dos, **Desenvolvimento de um biossensor para detecção de ácido benzóico em refrescos a base de guaraná**. Rio de janeiro 2016. Tese de Doutorado do Programa de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Benzoic acid salts, benzoates, are among most of preservatives in food industry, especially in soft drinks and low pH foods. Research reported in the literature report cases of adverse reactions to benzoates, even below the levels established by regulatory agencies, as well as being related to potential benzene formation in beverages, when in the presence of the antioxidant ascorbic acid. Given the above, there is the importance of monitoring the levels of preservative benzoate to not to exceed the established levels by the Brazilian legislation which is 0.05 g/100 mL, for non-alcoholic beverages. The High Performance Liquid Chromatography Efficiency (HPLC) is the official method of analysis benzoates in food, but although it is an established method, HPLC has some limitations such as, complexity, cost, and the application of highly trained operators. In this sense, the biosensors can offer some advantages, such as low relative cost, speed, portability, easy handling and less complex processing steps of samples. This work aims at the application of the enzyme of the macro fungi *Agaricus bisporus* extract as biological component in the construction of an electrochemical biosensor having transducer as an oxygen electrode to the benzoates detection in samples of non-alcoholic drinks Guarana based. To obtain tyrosinase were tested chemical cell disruption methods, with (permeabilization with ethanol, acetone and Triton X-100) and physically with liquid N_2, followed by concentration and partial purification with acetone and ammonium sulfate. Tyrosinase extraction with acetone, concentrated with ammonium sulfate, chitosan immobilized on supports, glass, sodium alginate and nylon. Immobilization on a nylon 6,6 membrane was optimized using a 2^3 factorial design followed by treatment with sodium borohydride. The free and immobilized enzymes were characterized with respect to enzyme activity (U/ml), operational and storage stability, pH, temperature, substrate concentration and determined the kinetic parameters (k_m and v_m). The immobilized enzyme nylon 6,6 membrane by covalent bonding with 1.5% of glutaraldehyde followed by crosslinking with 1.5% glutaraldehyde pH 6 without reduction with sodium borohydride resulting optimization was applied to the construction of standard curves to 5 sodium benzoate concentrations (0:01, 0:02, 0:05, 0:07, 0:09 g/100 mL) varying the substrate concentrations (0.4 mM, 0.6mm and 0.8mm L-tyrosine in 0.1M

sodium phosphate buffer at pH 6 25 ° C). The reaction time was fixed at 6 minutes, L-tyrosine substrate concentration was 0.8 mM for standard curve construction. The linear range was 0.01 g/100 ml to 0.07g/100 ml of sodium benzoate. The biosensor was applied in commercial samples of soft drink guarana base, but the results were not consistent with the results of HPLC analysis, showing relative error percentage above 10%.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema geral de um biossensor. 22
Figura 2 - Classificação geral dos biossensores. 24
Figura 3 - Mecanismo de ação de inibidores reversíveis..... 33
Figura 4 - Gráfico de Michaelis-Mentem. 36
Figura 5 - Grafico de Lineweaver-Burk. 37
Figura 6 - Gráfico de Lineweaver-Burk para inibição competitiva..... 38
Figura 7 - Métodos para imobilização de biocomponentes: 1) adsorção, 2) ligação covalente, 3) aprisionamento em matriz, 4) ligação covalente cruzada e 5) encapsulação 39
Figura 8 - Hidrólise do ácido benzóico. 45
Figura 9 - Teoria clássica da acidificação citoplasmática. 46
Figura 10 - Estrutura do sítio ativo da tirosinase..... 55
Figura 11 - Esquema simplificado do mecanismo de ação da tirosinase. 56
Figura 12 - Basidiocarpo do macrofungo *Agaricus bisporus*..... 57
Figura 13- Estrutura básica da membrana celular de um fungo. 60
Figura 14 - Perfil típico de precipitação com sulfato de amônio para proteínas de extratos crus. 63
Figura 15 - Esquema do eletrodo de oxigênio do tipo Clark..... 66
Figura 16 - Reação de catálise de monofenol (L-tirosina) a o-quinona com consumo de oxigênio. 67
Figura 17 - Dados sobre o consumo de refrescos per capita por região de 2005 a 2010. 68
Figura 18 - Consumo per capita do mercado brasileiro de refrescos e bebidas mistas dos anos de 2010 a 2014. 69
Figura 19 – Preparação das esferas de quitosana 80
Figura 20 - Representação esquemática da imobilização. A) Hidrólise com HCl 3M, B) Ativação com glutaraldeído (GA), C) Incubação do suporte ativado com o extrato enzimático, D) Enzima do extrato enzimático imobilizada covalentemente no suporte de nylon, E) Reticulação com GA. 83
Figura 21 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). (1) Padrões de massa moleculares (kDa), (2) Tirosinase de *Agaricus bisporus* comercial Sigma, (3) Extrato bruto do *Agaricus bisporus*, (4) precipitado da fração 0-20%, (5) precipitado da fração 20-40%, (6) precipitado da fração 40-60%, (7) precipitado da fração 60-80%, (8) precipitado da fração 80-100%..... 92
Figura 22 - Estabilidade do extrato enzimático bruto no período de 96 h 93
Figura 23 - Estabilidade do extrato enzimático bruto no período de 96 h 93
Figura 24 - Estabilidade do extrato enzimático bruto e parcialmente purificado..... 94
Figura 25 - Esferas de quitosana sem tratamento (a), ativadas com glutaraldeído (b) e após a imobilização da tirosinase por ligação covalente-reticulação (c)..... 96
Figura 26 - Membrana de nylon 6,6 sem tratamento (A) e com a enzima tirosinase imobilizada (B)..... 97

Figura 27 - Desempenho da enzima tirosinase em função da capacidade de carga do suporte de nylon. 98
Figura 28 - Gráfico de Pareto para a atividade enzimática da enzima tirosinase imobilizada em membrana de nylon 6, 6, em função dos valores da estatística do teste t de Student..... 100
Figura 29 - Superfície de resposta para a atividade da enzima tirosinase imobilizada em membrana de nylon 6,6 em função da concentração de glutaraldeído (GA1) e pH..... 100
Figura 30 - Superfície de resposta para a atividade da enzima tirosinase imobilizada em membrana de nylon 6,6 em função da interação GA2.pH..... 101
Figura 31- Estabilidade operacional das membranas com tirosinase imobilizada sem e com redução com NaBH4, durante 10 ciclos de reação. 101
Figura 32 - Atividade da tirosinase imobilizada em membrana de nylon 6,6, durante 5 dias com e sem tampão fosfato de sódio 0.1M pH6. 103
Figura 33 - Influência do pH na atividade enzimática da tirosinase do extrato de *Agaricus bisporus*, livre e imobilizada. 104
Figura 34 - Membranas contendo tirosinase imobilizada, na sequência: a) membrana com tirosinase imobilizada não submetida a reação com solução de substrato, b) reação com solução de substrato pH 5, c) reação com solução de substrato pH 6, d) reação com solução de substrato pH 7, e) reação com solução de substrato pH 8, f) reação com solução de substrato pH 9. Todas as reações foram realizadas utilizando tampão fosfato de sódio 0.1M. 104
Figura 35 - Influência da temperatura na atividade enzimática da tirosinase do extrato de *Agaricus bisporus*, livre e imobilizada. 105
Figura 36 - Influência da concentração do substrato L-tirosina na atividade enzimática da enzima livre (A) e imobilizada (B). 106
Figura 37 - Gráfico de 1/[s] versus $1/v_0$, segundo o método de Linearweaver-Burk. (A) enzima livre e (B) enzima imobilizada. 106
Figura 38 - Influência da concentração do substrato L-tirosina na inibição padrão da enzima tirosinase pelo inibidor benzoato de sódio. 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade enzimática e teor de proteínas dos extratos obtidos dos métodos de rompimento celular nos 3 lotes de cogumelos testados..... 89
Tabela 2 - Resultados das medidas das atividade enzimáticas das amostras de extratos oriundos de permeabilização celular com acetona submetidas a evaporação rotativa. 90
Tabela 3 - Resultados da precipitação sequencial das amostras de extratos da permeabilização com acetona com sulfato de amônio e acetona..... 91
Tabela 4 - Resultados da eficiência de imobilização (n%) do extrato enzimático nos suportes e métodos testados..... 95
Tabela 5 - Matrix experimental do planejamento fatorial 99
Tabela 6 - Analises estatísticas. R2 = 0,995; R2ajust. = 0,973 99
Tabela 7 - Constantes cinéticas para a enzima tirosinase comercial livre, tirosinase de extrato de *Agaricus bisporus* livre e tirosinase do extrato de *Agaricus bisporus* imobilizada em nylon 6,6. 106
Tabela 8 - Quantificação de benzoato de sódio em amostras comerciais de refrescos a base de guaraná usando o biossensor e método analítico CLAE, ... 108

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais áreas de aplicação dos biossensores na indústria alimentícia. 25
Quadro 2 – Alguns biossensores comerciais disponíveis para análises de alimentos. 29
Quadro 3 - Algumas enzimas utilizadas na construção de biossensores baseados no processo de inibição enzimática. 34
Quadro 4 - Algumas características físico-químicas do ácido benzóico e seus sais. 44
Quadro 5 - Percentagem do ácido benzóico não dissociado em função do pH..... 45
Quadro 6 - Concentração máxima de benzoato (expressa como ácido benzóico) em alguns países do mundo. 47
Quadro 7 - Alguns efeitos adversos relacionados ao consumo de benzoatos. 48
Quadro 8 - Análises de benzoatos em alimentos por HPLC/CLAE..... 51
Quadro 9 - Biossensores para detecção de benzoatos/ácido benzóico em amostras de alimentos 52
Quadro 10 - Aplicações de tirosinases macrofúngicas. 58
Quadro 11 - Métodos de extração de enzimas intracelulares. 59
Quadro 12 - Métodos de extração da enzima tirosinase a partir de macrofungos..... 61
Quadro 14 - Preparação dos géis de resolução e empilhamento 77
Quadro 15 - Parâmetros avaliados no planejamento fatorial..... 83
Quadro 15 - Influência do ácido ascórbico na inibição da enzima tirosinase em diferentes biossensores. 109

SUMÁRIO

CAPITULO 1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais.....17

CAPÍTULO 2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral.....20

2.2 Objetivos Específicos.....20

CAPÍTULO 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biossensores.....22

3.1.1 Características gerais.....22

3.1.2 Classificação dos biossensores.....23

3.1.3 Biossensores em análises de alimentos: principais áreas de aplicação.....24

3.1.3.1 Segurança de alimentos 26

3.1.4 Biossensores comerciais para análises de alimentos.....28

3.2 Enzimas como biocomponentes em biossensores.....30

3.2.1 A inibição enzimática como mecanismo de detecção em biossensores.....32

3.2.2 Cinética enzimática.....35

3.3 Imobilização de enzimas.....38

3.3.1 Adsorção.....40

3.3.2 Ligação covalente.....41

3.3.3 Ligação covalente cruzada.....42

3.3.4 Aprisionamento em matriz.....43

3.3.5 Encapsulação.....44

3.4 O analito: ácido benzóico e os benzoatos como conservantes alimentícios.....44

3.4.1 Toxicologia.....47

3.4.2 A formação de benzeno em alimentos.....49

3.4.3 Métodos analíticos de análises de benzoatos.....51

3.4.4 Biossensores para determinação de ácido benzóico.....52

3.5 Biorreceptor de trabalho: enzima tirosinase.....54

3.5.1 Características gerais.....54

3.5.2 O macro fungo *Agaricus bisporus*.....57

3.5.3 Tirosinase macrofúngicas e suas aplicações.....57
3.6 Extração de enzimas intracelulares: métodos de rompimento celular.....59
3.6.1 Rompimento celular de fungos.....60
3.7 Purificação parcial de enzimas: métodos de precipitação de proteínas.....62
3.7.1 Sulfato de amônio.....63
3.7.2 Solventes orgânicos.....64
3.7.3 Polímeros orgânicos.....64
3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....65
3.9 O transdutor de trabalho: eletrodo de oxigênio e oxímetro.....66
3.10. As amostras a serem analisadas: bebidas não alcoólicas a base de guaraná.....68

CAPÍTULO 4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos, materiais e reagentes.....71
4.2 Métodos.....73
4.2.1 Extração da enzima tirosinase.....73
4.2.1.1 Preparação das amostras do macro fungo *Agaricus bisporus*.....73
4.2.1.2 Permeabilização celular com solventes.....74
4.2.1.3 Remoção de resíduos de solventes dos extratos enzimáticos 74
4.2.1.4 Permeabilização com detergente (Triton X-100) 74
4.2.1.5 Congelamento/descongelamento com nitrogênio líquido.....75
4.2.2 Concentração do extrato enzimático por precipitação de proteínas.....75
4.2.2.1 Sulfato de amônio.....75
4.2.2.2 Acetona.....76
4.2.3 Caracterização dos extratos enzimáticos.....76
4.2.3.1 Determinação da atividade enzimática total 76
4.2.3.2 Determinação da concentração de proteínas totais.....77
4.2.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....78
4.2.3.4 Estabilidade de armazenamento dos extratos enzimáticos.....80
4.2.4 Imobilização da tirosinase em diferentes suportes..... 80
4.2.4.1 Tubo de vidro borossilicato.....80
4.2.4.2 Alginato de cálcio e quitosana.....81
4.2.4.3 Quitosana.....81
4.2.4.4 Membrana de nylon 6,6.....82

4.2.5 Determinação da atividade catalítica da enzima imobilizada e eficiência de imobilização.....83
4.2.6 Influência da carga enzimática na imobilização com membrana de nylon 6,6.....83
4.2.7 Planejamento fatorial para a otimização dos parâmetros da imobilização da tirosinase em membrana de nylon 6,6.....83
4.2.8 Estabilização da imobilização com borohidreto de sódio.....85
4.2.9 Estabilidade operacional da tirosinase imobilizada.....85
4.2.10 Estabilidade de armazenamento da tirosinase imobilizada..... 85
4.2.11 Determinação das melhores condições de desempenho da enzima tirosinase livre e imobilizada 85
4.2.11.1 Efeito do pH 85
4.2.11.2 Efeito da temperatura 86
4.2.11.3 Efeito da concentração do substrato e cálculos dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} 86
4.3 Constituição, princípio e funcionamento do biossensor 86
4.3.1 Calibração do sistema de transdução.....88
4.3.2 Curva padrão de inibição.....88
4.3.2.1 Efeito da concentração de substrato na inibição enzimática 88
4.4 Aplicação do biossensor em amostras comerciais 89

CAPÍTULO 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 Caracterização dos extratos enzimáticos.....90
5.1 Atividade enzimática total e teor de proteínas dos extratos.....90
5.1.1 Atividade enzimática dos extratos após remoção de resíduos de acetona.....91
5.2 Precipitação de proteínas.....92
5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....92
5.4 Estabilidade de armazenamento dos extratos enzimáticos.....94
5.5 Resultados dos métodos de imobilização 95
5.5.1 Eficiência de imobilização.....95
5.5.2 Capacidade de carga enzimática da membrana de nylon 6,6……...……98
5.5.3 Otimização dos parâmetros de imobilização em suporte de nylon…….……..99
5.5.4 Avaliação da estabilidade operacional após redução com borohidreto de sódio.....102
5.5.5 Estabilidade de estocagem da tirosinase imobilizada em suporte de nylon.....104
5.6 Resultados das melhores condições de desempenho da enzima tirosinase 104

5.6.1 Influência do pH.....104
5.6.2 Influência da temperatura na atividade de enzima.....105
5.6.3 Influência da concentração do substrato na atividade de enzima livre e imobilizada: cálculos dos parâmetros cinéticos da enzima livre (km e Vmax).....108
5.7 Curva padrão de inibição com benzoato de sódio: efeito da concentração de substrato.....109
5.8 Resultados da aplicação do biossensor em amostras comerciais.....109
6 CONCLUSÕES.....112
7 TRABALHOS FUTUROS.....114
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....115
9 ANEXOS.....136

1.1 Considerações Gerais

O conceito de segurança de alimentos implica na produção e comercialização de produtos alimentícios que não ofereçam risco a saúde do consumidor. O uso de aditivos é um dos procedimentos padrões da indústria de alimentos visando assegurar um maior tempo de vida útil, favorecendo a estocagem e transporte por longas distâncias (KOKYA; FARHADI; KALHORI, 2011; RICKE; DONALDSON; PHILLIPS, 2015).

O uso de aditivos é regulado por uma legislação específica, que varia de acordo com o país de origem, visando controlar as quantidades e tipos de aditivos incorporados aos alimentos, a fim de evitar fraudes, más práticas de fabricação, alergias e outras reações adversas ao consumidor, ocasionados por aditivos acima dos níveis considerados seguros (WATSON, 2002; MOTARJEMI; MOY; TODD, 2013).

As mudanças nos hábitos alimentares da população têm intensificado o uso de aditivos. O estudo de Martins et al., (2013), demonstrou que no Brasil, nas últimas três décadas houve uma significativa redução na participação calórica de alimentos *in natura*, minimamente processados e ingredientes culinários e aumento significativo na participação de alimentos prontos para o consumo (de 23% para 27,8% das calorias), devido ao aumento no consumo de produtos ultraprocessados (de 20,8% em 2002-2003 para 25,4% em 2008-2009).

Uma pesquisa de tendências temporais no consumo de alimentos ultraprocessados no Canadá, mostrou que o consumo destes produtos, expresso sobre a percentagem total de calorias adquiridas vem aumentando continuamente. Entre 1938 e 2011 houve uma queda no consumo de ingredientes culinários de 37% para 12,7% e minimamente processados de 34,3% para 25,6%. Os alimentos prontos para consumo tiveram aumento de 28,7% para 61.7%, sendo os ultraprocessados de maior participação nesse percentual de aumento (MOUBARAC et al., 2014).

Os sais do ácido benzóico, os benzoatos, estão dentre os conservantes de maior aplicação na indústria alimentícia, principalmente em bebidas não alcoólicas e alimentos de baixo pH, como molhos, geléias e outros (WHITEHURST; OORT, 2009; MOTARJEMI; LELIEVELD, 2013). Embora o consumo desses conservantes seja considerado seguro para a saúde humana, pesquisas reportadas na literatura, relatam casos de reações adversas (exacerbação de sintomas de rinite crônica e urticária, reações asmáticas, hiperatividade em crianças) em decorrência de seu consumo, mesmo estando abaixo nos níveis estabelecidos por agências reguladoras (PACOR et al., 2004; ASERO, 2006; EFSA, 2008; METCALFE; SAMPSON; SIMON, 2008; HASHIMOTO, 2011;

BEEZHOLD; JOHNSTON; NOCHTA, 2012; WARNER, 2013; WEDGE, 2015; JACOB et al., 2016). Além disso, diversos estudos vêm relacionando os benzoatos à formação de benzeno em bebidas, quando na presença do antioxidante ácido ascórbico sob determinadas condições de armazenamento (GARDNER; LAWRENCE, 1993; STADLER; LINEBACK, 2008; VINCI et al., 2011, 2012).

Devido às reações adversas descritas à saúde humana, verifica-se a importância de um controle rígido nas concentrações de benzoatos adicionadas aos alimentos, de modo que não excedam os limites estabelecidos previstos pela legislação, que no Brasil é de 0,05 g/100 mL para bebidas (MAPA, 2007) e 0,1 g/mL/mg para molhos e condimentos (ANVISA, 2007).

A necessidade de um monitoramento eficiente tem estimulado o desenvolvimento de metodologias de análise em complemento aos métodos cromatográficos que constituem os métodos oficiais de detecção de benzoatos. Nesse sentido, os biossensores podem oferecer algumas vantagens em relação aos métodos convencionais, como baixo custo relativo, rapidez, portabilidade, fácil manuseio e etapas menos complexas de tratamento das amostras (MUTLU, 2010).

Em termos gerais, biossensores são dispositivos que combinam a especificidade e a seletividade das reações e interações de componentes biológicos com o alto poder de processamento de transdutores eletrônicos. Existem diversas possibilidades de desenvolvimento de biossensores segundo o componente biológico e o transdutor escolhidos, cada um com suas vantagens e limitações técnicas específicas (RUMAYOR et al., 2005).

Biossensores desenvolvidos para análises de benzoatos em alimentos, geralmente são constituídos pela enzima tirosinase acoplada a transdutores eletroquímicos. O mecanismo de detecção, geralmente baseia-se no processo de inibição enzimática promovido pelo analito. A enzima tirosinase pode ser encontrada amplamente distribuída pela natureza, tanto em animais como vegetais e fungos, mas no desenvolvimento de biossensores predomina a tirosinase extraída do macro fungo *Agaricus bisporus*, disponível na forma purificada comercial ou utilizando o tecido fúngico como fonte enzimática (SILVA et al., 2013b).

A utilização de tecidos ou extratos enzimáticos a partir de vegetais e fungos como biorreceptores em alternativa a enzimas comerciais purificadas busca desonerar a construção de biossensores. Há diversos trabalhos na literatura reportando o uso tecidos ou extratos brutos ou

parcialmente purificados para a aplicação no desenvolvimento de metodologias analíticas (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002; GIL et al., 2009; SILVA; MELLO; SALGADO, 2014)

Os biossensores descritos na literatura para detecção de ácido benzóico, utilizam em sua maioria, a enzima tirosinase comercial na forma purificada, o que eleva os custos do desenvolvimento destes dispositivos (SHAN et al., 2007, 2008a; LI et al., 2010; LÓPEZ; LÓPEZ-RUIZ, 2011; KOCHANA et al., 2012).

Desse modo, este trabalho tem por finalidade a extração, concentração e purificação parcial otimizada do extrato enzimático da tirosinase obtido a partir do macro fungo *Agaricus bisporus*, visando a aplicação como componente biológico na construção de um biossensor para a detecção de benzoatos em amostras alimentícias, de bebidas não alcoólicas a base de guaraná.

2.1 Objetivo principal

Desenvolver um biossensor amperométrico baseado na inibição da enzima tirosinase para detecção e quantificação de ácido benzóico/benzoatos em amostras de bebidas não-alcóolicas a base de guaraná.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Testar e comparar métodos de extração da enzima tirosinase a partir do macro fungo *Agaricus bisporus*, utilizando os métodos de rompimento celular: químico e físico combinados: permeabilização celular empregando solventes (acetona e álcool etílico) e detergente (Triton X-100) + congelamento e descongelamento e físico (congelamento/descongelamento com emprego de nitrogênio líquido)
- ✓ Testar os métodos de concentração e purificação parcial dos extratos enzimáticos utilizando precipitação de proteínas com sulfato de amônio e acetona
- ✓ Caracterizar o extrato enzimático por meio da determinação da atividade enzimática, quantificação do teor de proteínas e determinação da massa molar por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida
- ✓ Verificar a estabilidade de armazenamento dos extratos enzimáticos brutos e parcialmente purificados
- ✓ Testar suportes e métodos de imobilização para a tirosinase do extrato enzimático de *Agaricus bisporus*: tubo de vidro borossilicato (ligação covalente), alginato de cálcio (encapsulação), esferas de quitosana (ligação covalente), membranas de nylon (ligação covalente, covalente cruzada)
- ✓ Determinar a atividade enzimática da tirosinase imobilizada e eficiência de imobilização dos métodos testados
- ✓ Determinar as melhores condições de imobilização do suporte/método escolhido, por meio de um planejamento fatorial
- ✓ Testar o borohidreto de sódio com o objetivo de aumentar a estabilidade operacional da enzima imobilizada
- ✓ Determinar a estabilidade operacional e de estocagem da enzima imobilizada.

- ✓ Determinar as melhores condições de desempenho da enzima tirosinase do extrato enzimático, livre e imobilizada: o efeito do pH, temperatura, concentração do substrato na atividade da enzima tirosinase e calcular os parâmetros cinéticos (k_m e v_m)
- ✓ Projetar o reator de vidro que compõe a câmara reacional do biossensor
- ✓ Determinação a concentração substrato para a construção da curva padrão do biossensor com as concentrações do analito inibidor.
- ✓ Aplicar o biossensor para quantificação do ácido benzóico/benzoatos em amostras reais e confrontar os resultados com o método padrão de determinação.

3.1 Biossensores

3.1.1 Características gerais

Um biossensor ou sensor biológico tem como definição, segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*): ‘’um dispositivo que utiliza reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas isoladas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células inteiras para detectar compostos químicos por meio de sinais elétricos, térmicos ou ópticos’’(IUPAC, 1997).

Esses dispositivos combinam a seletividade e especificidade de um elemento biológico de reconhecimento (biocomponente ou biorreceptor) e a capacidade de um elemento de transdução que converte a reação de biorreconhecimento entre o biorreceptor e o analito em um sinal quantificável, como a difusão de espécies eletroativas, mudança de temperatura, de massa ou de viscosidade, emissão ou absorção de luz, emissão ou consumo de gases (Figura 1) (SADANA, 2001; ZHANG; JU; WANG, 2011).

Um amplificador ou processador de sinal detecta, analisa e amplifica o sinal do transdutor que pode ser exibido em um monitor através de unidades de acordo com o tipo de sinal (MALHOTRA; TURNER, 2003).

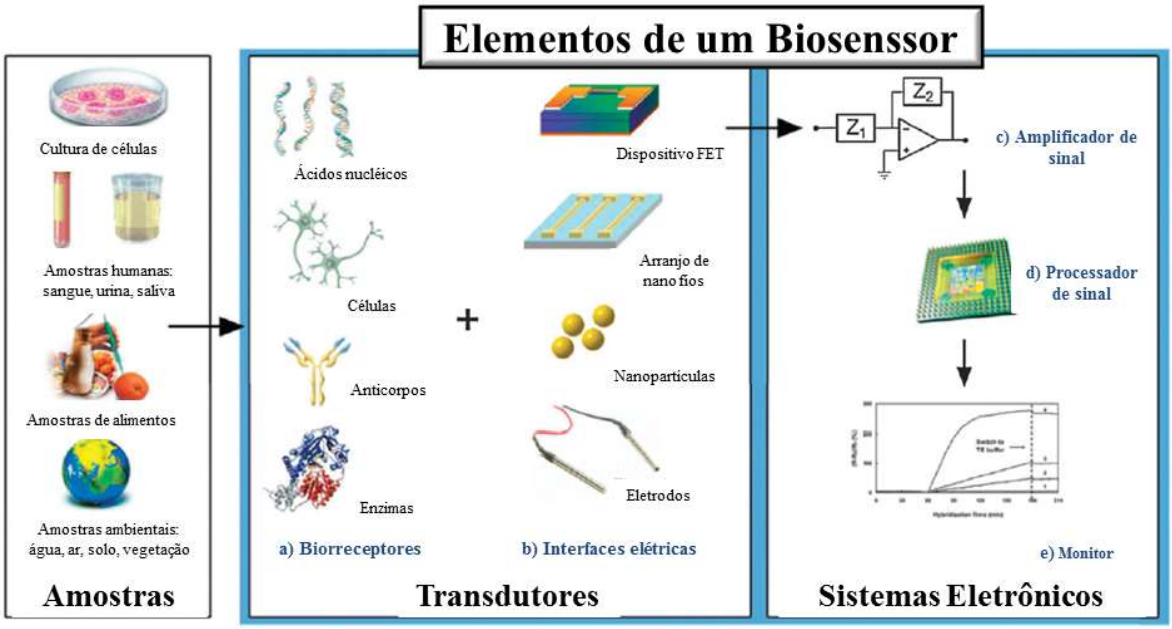


Figura 1 - Esquema geral de um biossensor.
Fonte: Adaptado de GRIESHABER et al., (2008).

Os diferentes tipos de biocomponentes e transdutores teoricamente oferecem possibilidades de combinações que atendem a um vasto conjunto de aplicações em diferentes áreas tais como, ambiental, clínica, segurança e qualidade de alimentos e etc (KOUGIANOS, 2006). No entanto, a escolha do biorreceptor está condicionada as características do analito enquanto que a escolha do transdutor está condicionada as características do biorreceptor (RUMAYOR et al., 2005; FURTADO; DUTRA, 2008).

Para que a alta especificidade de biomoléculas e sistemas biológicos em relação às interações intermoleculares de interesse possam ser exploradas com sucesso em biossensores, é essencial que o acoplamento entre os componentes biológicos e de transdução seja eficiente (RICHMAN; KRANZ; STONE, 2009).

A matriz de imobilização pode ser utilizada apenas com o suporte assim como pode influenciar na reposta do biossensor, no entanto qualquer método de imobilização deve visar manter o componente biológico em atividade máxima. Imobilizar o material biológico pode torná-lo reutilizável conferindo uma vantagem econômica, como no caso de biossensores enzimáticos. A seleção de um método de imobilização adequada depende da natureza do elemento biológico, tipo de transdutor utilizado, propriedades físico-químicas do analito e condições de funcionamento para o biossensor (MELLO; KUBOTA, 2002; SILVA et al., 2013b).

As características dos biossensores são dependentes do elemento biorreconhecimento e do transdutor de sinal utilizados, assim como a comunicação entre estes dois elementos, o que faz com que embora sejam promissores, também apresentem limitações e desvantagens como quaisquer outros métodos de análises (SERNA-COCK; PERENGUEZ-VERDUGO, 2011).

3.1.2 Classificação dos biossensores

A classificação dos biossensores baseia-se no sistema de transdução e no sistema de reconhecimento biológico (Figura 2).

Os elementos biológicos podem ser enzimas (mono ou multi enzimas), tecidos vegetais ou animais, microrganismos, organelas, receptores celulares, anticorpos, ácidos nucleicos (VISWANATHAN; RADECKA; RADECKI, 2009; VAN DORST et al., 2010).

Os elementos de transdução são geralmente eletroquímicos, ópticos ou piezoeléctricos. Os sinais elétricos podem basear-se numa alteração da corrente medida num potencial fixo aplicado (amperométrico); uma alteração na tensão medida entre os elétrodos (potenciométricos); uma

alteração na capacidade de transporte de carga (condutométrico). Os sensores ópticos geralmente medem absorção, fluorescência, quimiluminescência, ressonância de plasma de superfície ou mudanças na refletividade da luz . Sensores de massa de produzir um sinal com base na massa de produtos químicos que interagem com a superfície de detecção (GIARDI; REA; BERRA, 2011).

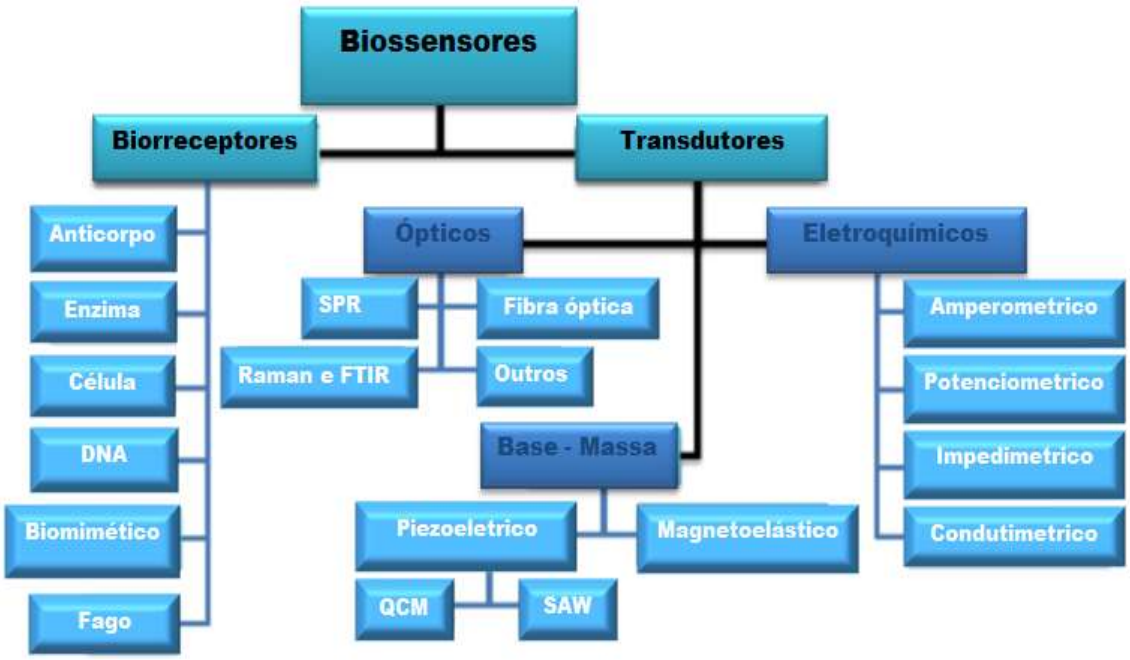


Figura 2 - Classificação geral dos biossensores.
Fonte: Adaptado de VELUSAMY et al., (2010).

Uma classificação alternativa pode ser feita através da combinação entre o tipo de biocomponente e o transdutor, como por exemplo, no caso de um biossensor cujo componente biológico é uma enzima e o transdutor um eletrodo de oxigênio (biossensor amperométrico enzimático) (THÉVENOT et al., 2001).

3.1.3 Biossensores em análises de alimentos: principais áreas de aplicação

A aplicação dos biossensores no âmbito da indústria de alimentos se orienta nas principais áreas: segurança de alimentos, qualidade de alimentos e controle de processos industriais (Quadro 1) (RUMAYOR et al., 2005; LEE, 2014). A produção de alimentos de alta qualidade e que não

ofereçam riscos à saúde do consumidor requerem o desenvolvimento de tecnologias de rastreabilidade em toda cadeia de produção.

Quadro 1 - Principais áreas de aplicação dos biossensores na indústria alimentícia.

Segurança de alimentos		
Compostos xenobióticos • Aditivos • Fármacos • Agrotóxicos • Metais pesados, dioxinas, PCB's, HPA's	Biotoxínas • Toxínas bacterianas • Toxínas fúngicas • Toxínas marinhas	Microrganismos patogênicos • Vírus • Bactérias • Protozoários
Controle de qualidade		
Composição dos alimentos • Açúcares • Aminoácidos • Álcoois • Ácidos orgânicos • Colesterol	Vida útil • Polifenóis e ácidos graxos (ranço) • Açúcares e ácidos orgânicos (maturação) • Aminas biogênicas (índice de frescor)	
Controle de processos		
• Açúcares (fermentação e pasteurização) • Ácido lático (produção de queijos) • Dióxido de carbono	• Aminoácidos (fermentação) • Álcoois (fermentação)	
Outras aplicações		
• OGM's	• Ciclo reprodutivo animal	

Fonte: Modificado de RUMAYOR et al., (2005) e LEE, (2014).

Os métodos tradicionais de análises, como por exemplo, os cromatográficos, constituem métodos robustos, reprodutivéis e sensíveis, mas geralmente exigem complexas etapas de tratamento das amostras e requerem operadores altamente treinados, o que torna o processo analítico, por vezes, dispendioso, além de aumentar o tempo de análise (JIMENÉZ; LEÓN, 2009).

Nesse sentido os biossensores tem se mostrado uma importante opção frente as ferramentas convencionais de análise, uma vez que oferecem algumas vantagens como, tamanho, custo, especificidade, tempo de resposta, precisão, sensibilidade, menor complexidade no pré-tratamento

das amostras e a possibilidade de ser incorporado a sistemas integrados (SERNA-COCK; PERENGUEZ-VERDUGO, 2011).

Biossensores mais comumente utilizados na análise de alimentos são baseados na combinação de transdutores eletroquímicos, particularmente os amperométricos, com enzimas oxidases e transdutores ópticos, principalmente SPR (Surface Plasmom Resonance) junto com anticorpos e ácidos nucleicos (SUN, 2011). Analitos, nomeadamente açúcares tais como, a sacarose e a dextrose (detectados pelas enzimas mutarotase, invertase e glucose oxidase), a lactose (detectada pela galactose oxidase), o etanol e o metanol (detectado pela álcool oxidase), a colina (detectada pela colina oxidase), o L-glutamato e L-glutamina (detectados pela L-glutamato oxidase), entre outros (USI LIFE SCIENCE, 2009). O sistema Biacore SPR (Surface Plasmom Ressonância) utiliza sequências de DNA complementares e anticorpos imobilizados para a detecção de agentes patogênicos, hormônios e antibióticos (GULLINO; BONANTS, 2014; FANG; RAMASAMY, 2015).

Novas oportunidades de melhorias na tecnologia dos biossensores tem surgido com o advento da nanotecnologia, uma vez que a integração da alta especificidade de componentes biológicos com as propriedades ópticas, elétricas e eletroquímicas dos nanomateriais, fornecem plataformas de detecção com sensibilidade superior as técnicas existentes (LAROU et al., 2013).

3.1.3.1 Segurança de alimentos

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano, milhões de pessoas em todo o mundo são afetados por doenças de origem alimentar. Os perigos biológicos produzidos por bactérias, vírus e fungos; substâncias químicas (como por exemplo, aditivos), nutrientes adicionados aos alimentos; agrotóxicos, resíduos de medicamentos veterinários; contaminantes gerados durante o processamento (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, acrilamida e etc) derivados da decomposição de proteínas, ou agentes mutagênicos (por exemplo, triptofano) em alimentos cozidos, constituem riscos para a saúde dos consumidores (WHO, 2008).

As condições de insegurança química, física ou biológica dos alimentos podem ser o resultado de contaminação ambiental ou falhas durante a manipulação, processamento, embalagem e distribuição de alimentos. Contaminantes alimentares podem ter origem no pré-processamento dos alimentos, originários de matérias primas; durante o processamento onde pode haver

contaminação ou formação de compostos tóxicos; durante o armazenamento devido a condições inadequadas (MUTLU, 2010).

A segurança dos alimentos consiste na produção e comercialização de alimentos que não ofereçam riscos à saúde dos consumidores (COCK; ARENAS; APONTE, 2009; MOTARJEMI; LELIEVELD, 2013). Nessa área, estão descritos na literatura, biossensores para análises de:

- xenóbióticos: aditivos, agrotóxicos, fármacos (CLAUDIA RUIZ-CAPILLAS, 2016);
- componentes do alimento: alergênicos, antinutrientes (ESCARPA; GONZALEZ; LOPEZ, 2015)
- toxinas: bacterianas, micotoxinas, toxinas marinhas (SERGEY YURISH, 2014);
- microorganismos patogênicos (DIMITRIOS P. NIKOLELIS, 2016).

O desenvolvimento de biossensores para a detecção de aditivos, geralmente, emprega enzimas como elementos de reconhecimento. Dispositivos enzimáticos para análises de edulcorantes artificiais como o sorbitol e aspartame (WANG et al., 2013) , de conservantes como o ácido benzóico (SILVA et al., 2013b), sulfitos (DINÇKAYA et al., 2007; SROYSEE et al., 2016) e glutamato monossódico (HONG; LEE; LEE, 2011; HUGHES et al., 2014) tem sido reportados. Em alguns casos reações de interferência acabam por diminuir a eficácia desses dispositivos, como no caso da determinação de sorbitol, cujos biossensores interagem também com o xilitol. Em alguns dispositivos para determinação de ácido benzóico também ocorrem interferências pela presença de antioxidantes como o ácido ascórbico, butilhidroxianisol (BHA) e propil galato (PATEL, 2002; SHAN et al., 2008b; LÓPEZ; LÓPEZ-RUIZ, 2011).

A administração de fármacos em animais pode resultar na presença de resíduos de medicamentos em alimentos de origem animal. Os biossensores desenvolvidos para essa finalidade são principalmente biossensores de bioafinidade combinados com transdutores ópticos utilizados para detectar antibióticos e promotores de crescimento (BISWAS et al., 2010; HUET et al., 2010; OZKAN; KAUFFMANN; ZUMAN, 2015).

Biossensores baseados na inibição enzimática tem sido reportados para a determinação de agrotóxicos em alimentos e água. Em relação à detecção de herbicidas, células íntegras ou organelas acopladas a transdutores ópticos e amperométricos, têm sido utilizados na construção de biossensores (RUMAYOR et al., 2005; PUNDI; CHAUHAN, 2012).

Componentes antinutricionais (oxalato, amidalinas e glucoalcalóides) ou alergênicos (glúten, por exemplo) podem estar contidos naturalmente nos alimentos. Os primeiros em sua maioria são detectados por biossensores amperométricos enzimáticos (RICCI; PALLESCHI, 2005), enquanto para os alergênicos são descritos imunossensores (SINGH et al., 2011; WEST et al., 2013).

Sensores para monitorar a qualidade dos alimentos também pode ser incorporado em embalagens para detectar produtos químicos, agentes patogênicos, toxinas e vários contaminantes, resultando na chamada embalagem inteligente (KERRY; BUTLER, 2008). Embalagem inteligente pode ser definida como uma embalagem que não só oferece proteção, mas fornece informações sobre o produto durante o transporte, distribuição e armazenamento, através de sensores integrados (KUSWANDI et al., 2011; YAM; LEE, 2012).

A detecção imunológica com anticorpos é a tecnologia que tem sido empregada com maior sucesso em biossensores comerciais para a detecção de bactérias, esporos, vírus e toxinas. O principal foco na detecção de patógenos e suas toxinas está na detecção de: *Clostridium perfringens, Bacillus cereus, Vibrio spp., Escherichia coli* O157:H7*, Salmonela spp, Campylobacter, Listeria monocytogenes,* enterotoxina estafilocócica tipo B (*Staphylococcus aureus*) e toxina botulínica (*Clostridium botulinum*) (MUTLU, 2010; WANG; YE; YING, 2012; LAW et al., 2014).

3.1.4 Biossensores comerciais para análises de alimentos

Biossensores são, em geral, dispositivos altamente seletivos, sensíveis, de custo relativamente baixo e de fácil manuseio e integração em sistemas de análise contínuas. Uma aplicação bem sucedida de tais sensores para fins industriais, no entanto, requer um desenho do sensor, que satisfaça as necessidades específicas de monitoramento do analito alvo na aplicação em particular, uma vez que cada aplicação individual necessita de diferentes condições de funcionamento e características do sensor (CUYPER; BULTE, 2001; BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2015). Desse modo, a imensa oportunidade de desenvolvimento e o potencial de mercado, tem impulsionado as pesquisas de métodos de análises para a área de alimentos em termos de biossensores (VISWANATHAN; RADECKA; RADECKI, 2009; THAKUR; RAGAVAN, 2013; MOSCONE et al., 2016).

No entanto, a aplicação de biossensores comerciais na área de alimentos não é tão comum quanto na área clínica, embora o número de publicações sobre o desenvolvimento de biossensores

para análises de alimentos seja expressivo. Monošík; Streďanský; Šturdík, (2012), apontaram a complexidade e variabilidade dos tipos de amostras na área de alimentos em comparação com a área clínica, o que tornaria mais difícil a concepção e otimização das condições de medição. As limitações do uso destes dispositivos na indústria agroalimentar podem ser atribuídas a características estruturais do setor alimentício, tais como, legislação, inércia metodológica e capacidade de absorção (RUMAYOR et al., 2005; COCK; ARENAS; APONTE, 2009).

Kirsch et al., (2013) e Barthelmebs et al., (2010), reportaram em suas revisões sobre os recentes avanços em tecnologia de biossensores, a existência de pesquisas suficientes para resolver a maior parte dos problemas associados a sistemas de transdução, através da combinação das diversas plataformas existentes (ópticas, eletroquímicas, piezoelétricas e etc). No entanto, o gargalo dos biossensores reside na relativa falta de compreensão do elemento biológico de reconhecimento: como este se liga a superfície; suas possíveis alterações durante a imobilização; a forma de promover sua estabilidade por longos períodos de tempo nas condições ambientais nas quais as análises são realizadas. A parte dos obstáculos a serem ainda superados pela tecnologia dos biossensores, o potencial de aplicação desses dispositivos é uma realidade.

No Quadro 2, estão citados alguns biossensores comercialmente disponíveis para análises de alimentos.

Quadro 2 – Alguns biossensores comerciais disponíveis para análises de alimentos.

Empresa	**Biossensor – analito**	**País**
Oriental electric	Freshness Meter KV-101 – Índice de frescor do peixe	China
Massachusetts Institute of Technology	CANARY – E. *coli* O157:H7 em alface	EUA
Molecular Circuitry Inc.	Detex™ – E. *coli 0157 Salmonella, Listeria, Campylobacter*	EUA
Research International	Analyte 2000 ™ – Proteínas , vírus, bactérias, e esporos FAST 6000™ – Toxínas, vírus, bactérias, esporos, e fungos Raptor™ – Seis analítos simultanemente	EUA
Universal Sensors	ABD 3000 Biosensor – Etanol, metanol, glicose, sacarose, lactose, L-aas Assay System – glutamato, ácido ascórbico e oxalato	EUA
Texas Instruments Inc.	Spreeta™ – Alergênicos de amendoim, antibióticos	EUA
Yellow Springs Instruments Co	YSI 2700 SELECT™ – Glicose, sacarose, lactose, L-lactato, galactose Biochemical Analyzer – L-glutamato, etanol H_2O_2, amido, glutamina, colina	EUA

Affinity Sensors	IASys plus™ e IASys Auto+Advantage™ – *S. aureus*, toxina colérica	Reino Unido
Ambri Limited	AMBRI Biosensor – *Salmonella e Enterococcus*	Austrália
Biacore AB	Biacore® – Vitaminas hidrossolúveis, resíduos químicos e veterinários, micotoxinas	Suécia
BioFutura Srl	PerBacco2000 e 2002 – Glicose, frutose, ácido málico e lático (fermentação)	Itália
Chemel AB	SIRE™ – Glicose, sacarose, etanol, metanol e lactato	Suécia
Motorola	ESensor™ – Microrganismos e OGMs	Japão
Inventus Bio Tec	AscoSens – Ácido ascórbico	Alemanha
Dupont Qualicon, Inc.	BAX system – *E.coli O157:H7, Campylobacter, Salmonella, Listeria*, enterobaterias, vibrião Lateral Flow System – *E.coli O157:H7*, *Listeria, Salmonella*	USA
Neogen	Reveal® – *E.coli O157:H7*, *Listeria, Salmonella* GeneQuence® – *E.coli O157:H7, Salmonella* ANSR® – *Listeria e Salmonella*	Reino Unido
Biomèrieux	Vidas – *E.coli O157:H7, Campylobacter, Listeria*, enterobaterias ACCUPROBE – *Campylobacter*	França
Sensolytics	OLGA – glicose, lactato, etanol, glutamato, sacarose	Alemanha
Tectronik	SensytecOne – Glicose, lactato e malato	Itália

Fonte: Adaptado de BARTHELMEBS et al., (2010); FURTADO; DUTRA, (2008); RUMAYOR et al., (2005); SINGH; POSHTIBAN; EVOY, (2013).

3.2 Enzimas como biocomponentes em biossensores

Em função da especificidade e propriedades catalíticas das enzimas, estas têm sido amplamente utilizadas como biorreceptores no desenvolvimento de biossensores para aplicação em diversas áreas, tais como, ambiental, clínica e de alimentos (ZHAO; JIANG, 2010; MONOSIK et al., 2012).

Dentre os grupos de elementos de reconhecimento, o das enzimas é o mais comumente utilizado no desenvolvimento de biossensores. Dentre as enzimas comercialmente disponíveis, as oxidases são as mais utilizadas, devido a estabilidade, e em alguns casos não requerem coenzimas como cofatores. O melhor exemplo de biossensor enzimático comercial disponível, é o sensor de glicose. Estima-se que um valor de 85% do mercado de biossensores seja atribuído ao biossensor de glicose apenas para a área clínica (MELLO; FERREIRA; KUBOTA, 2010; TURNER, 2013).

Um biossensor enzimático, combina como biocomponente uma enzima a qual reage seletivamente com um substrato, acoplada a um transdutor que pode ser eletroquímico, óptico, térmico ou gravimétrico. Dentre os transdutores eletroquímicos, os amperométricos são os mais utilizados e importantes comercialmente (MUTLU, 2010; RIPP; DICLAUDIO; SAYLER, 2010).

O uso de extratos e tecidos de vegetais e fungos como fonte de enzimas na construção de biossensores é uma alternativa, que pode ser economicamente vantajosa em relação ao uso das enzimas comerciais disponíveis. Geralmente, nesse tipo de abordagem, as enzimas utilizadas na construção dos dispositivos analíticos podem estar dispostas dentro da célula íntegra ou podem ser extraídas e parcialmente ou totalmente purificadas (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002; SILVA; SALGADO; COELHO, 2010; SILVA et al., 2013a; BRISOLARI; GONÇALVES, 2014a; SADEGHI; FOOLADI; MALEKANEH, 2014; SILVA; MELLO; SALGADO, 2014).

Biossensores baseados em células inteiras podem ser mais baratos do que enzimas extraídas purificadas, e além disso, são mais estáveis pelo fato da enzima se encontrar em seu ambiente natural. Por outro lado, estes biossensores geralmente, apresentam longos tempos de resposta e baixa especificidade devido à presença de múltiplas enzimas dentro da célula (EGGINS, 2008).

De um modo geral o uso de enzimas em biossensores pode oferecer algumas vantagens: seletividade; ser um elemento de biorreconhecimento passível de seu obtido a partir de fontes biorrenováveis; possibilidade de modificação das propriedades catalíticas ou da especificidade em relação ao substrato por meio de engenharia genética e amplificação catalítica da resposta do biossensor por meio da modulação da atividade da enzima em relação ao analito alvo (PALCHETTI; MASCINI, 2011).

Dentre as desvantagens podem ser citados: alto custo das enzimas purificadas e possibilidade de perda de atividade catalítica durante a imobilização e armazenamento (EGGINS, 2008; KIRSCH et al., 2013a).

Biossensores enzimáticos podem ser classificados de acordo com a abordagem de detecção:

1) investigação do produto, resultante da ação da enzima, derivado do metabolismo do analito;

2) investigação do decréscimo da atividade enzimática em função do poder inibitório do analito (AMINE et al., 2006; ARDUINI; AMINE, 2014). Nesse caso o potencial em relação ao eletrodo de referência é fixo e o fluxo de corrente gerado na superfície do eletrodo de trabalho é

medido devido à oxidação ou redução do produto da reação enzimática, cujo sinal é correlacionado a concentração do substrato (LÓPEZ; LÓPEZ-RUIZ, 2011).

3.2.1 A inibição enzimática como mecanismo de detecção em biossensores

Um inibidor enzimático é uma substância que pode reduzir a taxa de uma reação catalisada por uma enzima. A perda da atividade pode ser reversível, quando a atividade pode ser recuperada por meio da remoção do inibidor, no entanto quando a atividade não pode ser recuperada dentro de uma escala de tempo de interesse, a inibição é irreversível (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). Os inibidores reversíveis são classificados em: competitivos, não competitivos, incompetitivos e mistos (competitivo/incompetitivo) (Figura 9) (CHANG, 2009).

a) Inibidores competitivos: apresentam características estruturais semelhante às do substrato competindo com o mesmo pelo sítio ativo da enzima. Quando ligado à enzima forma um complexo inativo enzima/inibidor (EI) impedindo-a de realizar outra catálise. No entanto esse processo é reversível com a adição de mais substrato o equilíbrio pode ser deslocado de modo a favorecer a formação do complexo enzima-substrato (ES)

b) Inibidores não-competitivos: o inibidor não compete com o substrato pelo mesmo sítio ativo da enzima, se ligando um sítio ativo diferente não havendo, portanto, a possibilidade de reverter a inibição por meio de adição de substrato. Ocorre a formação de um complexo entre a enzima/ inibidor (EI) e entre o enzima / substrato / inibidor (ESI)

c) Inibidores incompetitivos: se ligam ao mesmo sítio dos inibidores não competitivos, a diferença é que no caso dos inibidores incompetitivos, estes se ligam apenas ao complexo enzima/substrato formado (ESI)

d) Inibidores mistos (competitivo/incompetitivo): Se ligam tanto com a enzima livre quanto com o complexo enzima/substrato (ES) (MARQUES; YAMANAKA, 2008; CHANG, 2009).

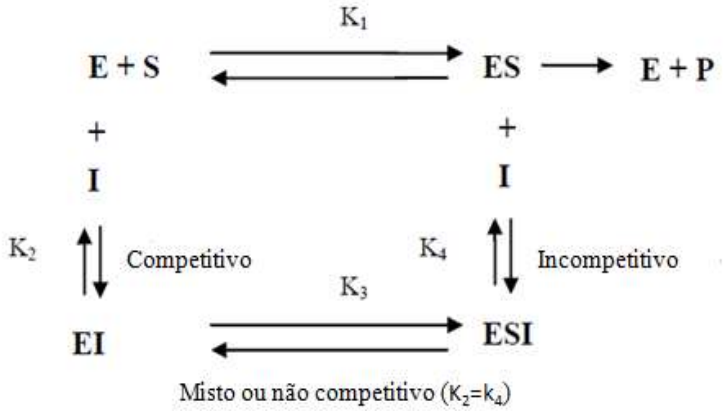


Figura 3 - Mecanismo de ação de inibidores reversíveis.
Fonte: Adaptado de CHANG,(2009).

Além do mecanismo de inibição, a força inibitória expressa com o valor de IC_{50} e definida como sendo a concentração de um inibidor necessária para inibir metade da atividade da enzima na condição testada, é o critério primário de um inibidor.

A inibição enzimática gerada por um analito inibidor, pode ser utilizada como sinal analítico a ser monitorado em biossensores, onde a atividade é medida antes e depois da inibição promovida por um inibidor específico, num dado intervalo de tempo. O percentual de inibição pode ser calculado pela equação 1, descrita a seguir (LI et al., 2010):

$$\%\boldsymbol{In} = [\boldsymbol{S1} - (\boldsymbol{S2}/\boldsymbol{S1})]\boldsymbol{x100} \qquad \text{Equação 1}$$

Onde:

% In: percentagem de inibição

S1: A resposta inicial (S1) do biossensor em uma dada concentração de substrato na ausência do inibidor

S2: A resposta corrente (S2) do biossensor na dada concentração de substrato na presença de um inibidor de determinada concentração

O percentual de inibição sofrido pela enzima está relacionado de modo quantitativo com a concentração do inibidor. A equação supracitada, pode ser utilizada tanto para reações de inibição enzimática reversíveis e quanto para as reações irreversíveis. No entanto, nas inibições reversíveis, a interação entre o inibidor e sítio ativo da enzima é não-covalente, podendo o inibidor ligar-se ao sítio ativo (inibição competitiva) ou ao complexo enzima substrato (inibição não competitiva) (UPADHYAY; VERMA, 2012).

Em ambos os casos, depois da medida da inibição, a atividade enzimática pode ser recuperada. Por outro lado, na inibição irreversível, o inibidor se liga covalentemente ao sítio ativo da enzima, o que resulta na sua inativação, sendo necessários, a reconstrução do biossensor com nova carga enzimática ou procedimentos de reativação da enzima após a inibição, utilizando reagentes específicos (PREEDY; PATEL, 2012).

Em combinação com os diversos tipos de transdutores, várias enzimas (colinesterases, uréase e tirosinases) têm sido utilizadas na construção de biossensores baseados no princípio da inibição enzimática, empregados na detecção de uma ampla gama de analitos tais como pesticidas oganofosforados e organoclorados, derivados de inseticidas, metais pesados e outros contaminantes químicos implicados na segurança de alimentos e ambiental (Quadro 3) (AMINE et al., 2006; COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; MARQUES; YAMANAKA, 2008; UPADHYAY; VERMA, 2012; SILVA et al., 2013b; ZHANG et al., 2015).

O ácido benzóico estudado como analito alvo no presente trabalho, é classificado como um inibidor reversível, competitivo da enzima tirosinase (MORALES et al., 2002; TOPÇU; SEZGINTÜRK; DINÇKAYA, 2004; SHAN et al., 2008b; LI et al., 2010; BRISOLARI; GONÇALVES, 2014b).

Quadro 3 - Algumas enzimas utilizadas na construção de biossensores baseados no processo de inibição enzimática.

Enzima	Reação catalisada	Inibidor
Colina oxidase	colina + O2 → aldeído betaina + H2O2	organofosforados, carbamatos, Ag+, Cu+, Hg2+

Colinesterase	acetil (butiril) colina + H2O → colina + ácido acético	organofosforados, carbamatos, metais. nicotina, microcistinas
Fosfatase	glucose-6-fosfato + H2O → glucose + fosfato inorgânico	organofosforados, carbamatos, microcistinas
Glucose oxidase	beta-D-glucose + O2 → D-glucono-1,5-lactone + H2O2	hidroxiquinolina, adenina nucleotídeo, Ag+, Br-, Cl-, CN-, CuSO4, Hg+, hidrazina
Lactato desidrogenase	lactato + NAD+ → piruvato + NADH+	fluoropiruvato, ADP, ATP, Cd2+, citrato, CO2, glutamato, Hg2+, Mn2+, piruvato
Peroxidase	ROOR' + doador (2 e-) + 2H+ → ROH + R'OH	tiuréia, etilinotiuréia, sulfitos, mercúrio
Tirosinase	monofenol + ½ O2 → O-diidroxifenol O-diidroxifenol → O-quinona	benzoatos, carbamatos, organofosforados, atrazinas, tiuréas, herbicidas, clorofenóis, agentes quelantes
Urease	uréia + H2O → CO2 + 2 NH3	metais, Hg2+, Mg2+, tiuréia

Fonte: Adaptado de (MARQUES; YAMANAKA, 2008).

3.2.2 Cinética enzimática

Muitos dos biossensores enzimáticos desenvolvidos baseiam-se no mecanismo de inibição competitiva, onde o inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Logo, a concentração de substrato é um fator importante na construção de biossensores baseados na inibição enzimática competitiva (BANICA, 2012).

Uma etapa importante no desenvolvimento desse tipo de biossensor é a determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Mentem: velocidade inicial (V_0) velocidade máxima (v_{max}), constante de afinidade entre a enzima e o substrato (k_m), constante aparente de afinidade entre o substrato e a enzima imobilizada (k_{map}) e a constante de inibição (K_i). A afinidade entre a enzima e o substrato é inversamente proporcional ao valor numérico do k_m. Por meio desses estudos cinéticos, é possível determinar a afinidade de ligação entre substratos e inibidores a uma enzima (GÖPEL et al., 2008). A constante k_m pode ser calculada de acordo com a equação de Michaelis-Mentem:

$$V_o = \frac{Vmax.[S]}{Km+[S]} \qquad \text{Equação 2}$$

Onde: V_0= taxa de reação

v_{max}= velocidade máxima

S= concentração de substrato

k_m= constante de afinidade entre enzima e substrato

A atividade enzimática é medida a partir de uma concentração fixa de enzima e variando-se a concentração de substrato de modo crescente, até que a enzima atinja a o equilíbrio estacionário alcançando a velocidade máxima. A concentração de substrato que produz metade da velocidade máxima, é numericamente igual ao k_m (Figura 4). O ideal é que um biossensor exiba um valor de k_m, próximo ao da enzima em solução (ARDUINI; AMINE, 2014). Os parâmetros cinéticos k_m e v_m são específicos e característicos para cada enzima, sob determinadas condições de pH, temperatura, força iônica e outros (BARONAS et al., 2009).

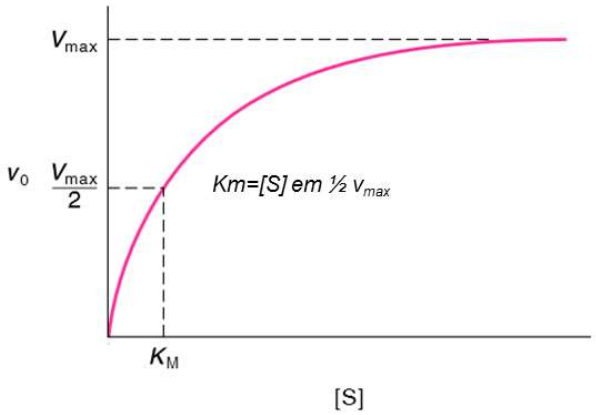


Figura 4 - Gráfico de Michaelis-Mentem.
Fonte: Adaptado de (CHANG; COLLEGE, 2005).

O método para calcular os parâmetros cinéticos, mais comumente utilizado é o de Lineweaver-Burk, que consiste da linearização da equação (2) de Michaelis-Mentem (WHITFORD, 2005), resultando na equação (3):

$$\frac{1}{Vo} = \frac{Km}{Vmax} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmax} \qquad \text{Equação 3}$$

O gráfico de $1/v_m$ versus 1/[S] resulta em uma reta com inclinação igual a k_m/v_m e intercepto no eixo y igual a $1/v_{max}$ e eixo x, $-1/k_m$ (Figura 5) (LINEWEAVER; BURK, 1934).

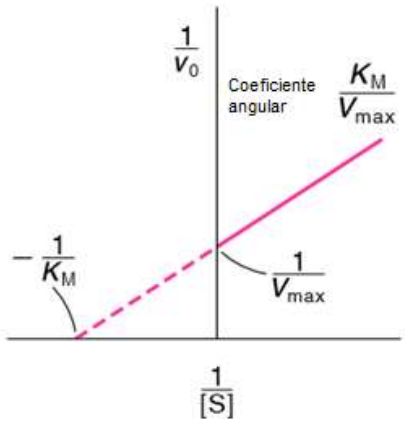


Figura 5 - Gráfico de Lineweaver-Burk.
Fonte: Adaptado de (CHANG; COLLEGE, 2005).

Para biossensores baseados em inibição competitiva, o inibidor pode ligar-se ao centro ativo da enzima em competição com o substrato. Este equilíbrio é regulado pela constante de inibição (k_i), que descreve a afinidade do inibidor pela enzima. O uso de altas concentrações de substrato em biossensores por inibição competitiva, impede a detecção de baixas concentrações do inibidor. O valor do k_i é diretamente proporcional ao aumento da concentração do substrato. Por essa razão a escolha da concentração de substrato deve atender a necessidade de um bom sinal analítico e um efeito de inibição detectável para o analito (ARDUINI; AMINE, 2014).

Na presença de um inibidor competitivo tem-se a equação de Michaelis-Mentem (Equação 4):

$$\boldsymbol{Vo = Vmax.\frac{[S]}{Km\left(1+\frac{[I]}{Ki}\right)+[S]}} \qquad \text{Equação 4}$$

Aplicando a linearização de Lineweaver-Burk na equação 4, tem-se a Equação 5:

$$\frac{1}{Vo} = \frac{Km\left(1+\frac{[I]}{Ki}\right)}{Vmax} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmax} \qquad \text{Equação 5}$$

A determinação da constante de inibição (k_i), pode ser feita por meio de gráficos de Lineweaver-Burk, para a reação na presença e na ausência do inibidor (Figura 6).

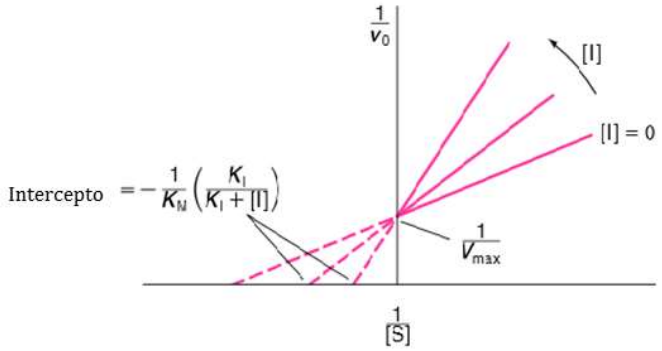


Figura 6 - Gráfico de Lineweaver-Burk para inibição competitiva.
Fonte: Adaptado de (CHANG; COLLEGE, 2005).

Cineticamente, a inibição competitiva afeta inclinação dos gráficos de Lineweaver-Burk sem modificar a velocidade máxima, logo a constante de afinidade da enzima pelo substrato, k_m, aumenta à medida que aumenta a concentração do inibidor (BILITEWSKI; TURNER, 2000).

3.3 Imobilização de enzimas

A possibilidade de imobilização de enzimas a um suporte é fundamental do ponto de vista econômico, pois elimina a necessidade da adição de uma nova carga de enzimas a cada nova reação, o que tornaria o emprego de enzimas dispendioso (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). Além disso, a imobilização pode conferir maior estabilidade, atividade e seletividade e consequente melhoria no desempenho da enzima, além de evitar a dissociação de subunidades de enzimas multiméricas (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; MOHAMAD et al., 2015).

A estabilidade e atividade das enzimas são um reflexo das condições ideais de seu ambiente natural. Remoção de um enzima a partir de suas condições nativas para uso em um sistema

concebido pode alterar a dinâmica da proteína com o seu ambiente, e pode alterar o equilíbrio molecular entre o estado nativo e desdobrado da proteína. Ao compreender a natureza específica da enzima a ser imobilizada, em relação aos mecanismos de desdobramento que podem ocorrer quando em contato com a superfície de um material, as estratégias podem ser desenvolvidas para manter ou melhorar a atividade do conjugado imobilizado (TALBERT; GODDARD, 2012).

A escolha de estratégias de imobilização adequadas consiste na etapa mais complexa durante o desenvolvimento de um biossensor. No caso de enzimas a ligação a superfície de imobilização pode ocorrer pelo sítio ativo da enzima obstruindo-o, o que pode levar à perda parcial ou total de sua atividade biocatalítica (OLIVEIRA; VIEIRA, 2006; MARQUES; YAMANAKA, 2008).

Os métodos de imobilização mais comumente utilizados para imobilização de enzimas na construção de biossensores consistem, basicamente, em: adsorção, ligação covalente, ligação covalente cruzada, (*crosslinking*) em suportes sólidos e o aprisionamento em matriz e encapsulamento (Figura 7) (MONOŠÍK; STREĎANSKÝ; ŠTURDÍK, 2012).

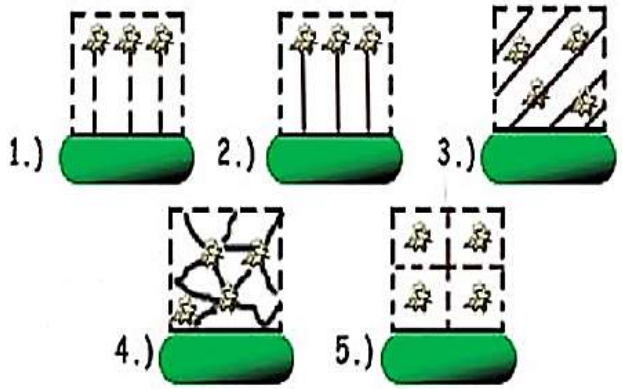


Figura 7 - Métodos para imobilização de biocomponentes: 1) adsorção, 2) ligação covalente, 3) aprisionamento em matriz, 4) ligação covalente cruzada e 5) encapsulação
Fonte: Adaptado de (MONOŠÍK; STREĎANSKÝ; ŠTURDÍK, 2012).

O desenvolvimento de metodologias de imobilização precisa considerar muitos fatores a fim de preservar a capacidade de biocatálise da enzima: propriedades do material de imobilização (hidrofobicidade/hidrofilicidade, carga, tamanho e topografia da superfície), propriedades da enzima (anfifilicidade, grupos ionizáveis, rigidez e estrutura multiméricas), propriedades da interface enzima/material/solução de substrato (efeito de microambiente, influência dos ligantes

químicos e carga enzimática) e condições experimentais (pH, temperatura) (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012; TALBERT; GODDARD, 2012; SANTOS et al., 2015).

Protocolos de imobilização podem ser desenvolvidos a partir da combinação de vários métodos de imobilização. Um exemplo disso, seria a imobilização de uma enzima em esferas, por adsorção ou ligação covalente, para posterior aprisionamento em um polímero poroso (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012).

Para o desenvolvimento de biossensores enzimáticos um dos métodos mais comumente utilizados para imobilização de enzimas é a ligação cruzada com glutaraldeído. Este método confere alta estabilidade operacional ao biossensor ainda que usualmente possa ocorrer um decréscimo na afinidade enzimática pelo substrato devido a distorções na estrutura da enzima, com consequente valor da constante de afinidade aparente entre enzima e substrato (k_{mpp}) maior do que a constante de afinidade entre a enzima e o substrato (k_m) (ARDUINI et al., 2007).

3.3.1 Adsorção

Os métodos de imobilização baseados em ligações não-covalentes podem ser classificados em adsorção (CAO, 2006):

- Física não-específica: adsorção por forças não específicas como força de Van der Waals, interações hidrofílicas e pontes de hidrogênio
- Bioespecífica: introdução de ligantes bioespecíficos da enzima em um suporte
- Por afinidade: adição de metais ao suporte
- Por interação hidrofóbica: interação de regiões hidrofóbicas da enzima e do suporte funcionalizado
- Por ligação iônica: interação eletrostática entre as cargas da enzima e do suporte

A adsorção constitui um conjunto de métodos mais simples de imobilização física. A enzima em solução é deixada em contato com o material sólido de imobilização, por um período de tempo. Os métodos adsortivos são simples e possibilitam alta retenção da atividade enzimática, porém, em geral, a estabilidade operacional e de estocagem são comprometidas devido as fracas ligações com o suporte, podendo haver perdas significativas da carga enzimática, por meio da dessorção causada por alterações de temperatura, pH e força iônica (CHOI, 2004).

Visando resolver essas limitações uma série de modificações químicas em suportes vem sendo desenvolvidas nas últimas décadas tais como, silanização (AISSAOUI et al., 2013; ANIRUDHAN; RAUF, 2013), deposição de nanopartículas de ouro (WANG et al., 2009), funcionalização de superfície com peptídeos (FU; REINHOLD; WOODBURY, 2011) e o desenvolvimento de métodos combinados de adsorção-aprisionamento (TANRISEVEN; ULUDAĞ; DOĞAN, 2002), adsorção-ligação covalente (DONG et al., 2012), adsorção-reticulação (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005).

3.3.2 Ligação covalente

A imobilização por ligação covalente possibilita ligações mais fortes entre a enzima e o suporte em comparação a métodos de adsorção. Em geral, a ligação covalente entre uma enzima e um suporte é baseada na reação química entre os resíduos de aminoácidos ativos localizados na superfície da enzima (não necessários a atividade catalítica) ou introduzidos para essa finalidade e funcionalidades ativas que estão ligados à superfície do suporte ou vice-versa (GUISAN, 2006).

As ligações covalentes podem prover algumas vantagens às enzimas tais como: baixa dessorção da carga de enzimas durante o uso, fácil acesso do substrato a enzima e aumento da estabilidade térmica da enzima devido sua forte ligação ao substrato. Por outro lado, podem ser citadas as seguintes desvantagens: modificações na estrutura da enzima podem causar a destruição de estruturas ativas da enzima, a rigidez causada pela forte interação entre o suporte e a enzima pode causar perdas na retenção da atividade (AEHLE, 2006).

As enzimas são ligadas ao suporte ativado, geralmente por meio de reagente multifuncionais (glutaraldeído, carbodiimida). O suporte pode constituir-se de materiais como vidro, celulose, polímeros sintéticos e membranas pré-ativadas. Biorreagentes como o glutaraldeído ou carboiimida, são amplamente utilizados em biossensores enzimáticos que tem aumentada a estabilidade enzimática (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012).

A ligação química por meio de cadeias laterais de aminoácidos que é frequentemente aleatória, uma vez que é baseada em resíduos normalmente presentes no exterior da proteína. Portanto, a ligação pode ocorrer simultaneamente, através de muitos resíduos, aumentando a heterogeneidade na população de proteínas imobilizadas. O problema nesse caso se refere a quantidade elevada de biorreagentes necessária e a reprodutibilidade, que em geral, é baixa (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012).

A ligação entre a enzima e o suporte pode ocorrer de modo ordenado para atingir uma imobilização orientada evitando a desnaturação da proteína, permitindo reprodutibilidade e estabilidade conformacional (RUSMINI; ZHONG; FEIJEN, 2007).

Desse modo alguns fatores importantes precisam ser levados em conta na imobilização por ligações covalentes: localização dos resíduos necessários a ligação, pH de imobilização adequado ao ataque nucleofílico, flexibilidade conformacional requerida pelo mecanismo catalítico (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009).

3.3.3 Ligação covalente cruzada

A ligação cruzada é um método de imobilização de enzimas irreversível sem o requerimento de um suporte. As enzimas são reticuladas com o uso de um agente bifuncional com o di-isocianato e glutaraldeído. Existem dois métodos principais de ligação covalente cruzada: Agregados de Enzima por Ligação Cruzada (CLEA) e Cristais de Enzima por Ligação Cruzada (CLEC). Ambos são derivados a partir de um método desenvolvido em 1960 envolvendo o uso de glutaraldeído, que reage com os grupos NH_2 na superfície da proteína (CLE). O primeiro pode ser preparado por meio da precipitação de enzimas utilizando sais ou solventes, seguida pelo uso de um agente de ligação cruzada, sendo o mais comum o glutaraldeído. Já o segundo, exige alto grau de pureza da enzima (GÓRECKA; JASTRZĘBSKA, 2011).

O CLEA é um método simples, de rápida otimização, baixo custo e curto tempo de preparação. Pode ser aplicável a uma grande variedade de enzimas, incluindo extratos brutos, promovendo estabilidade e alta retenção da atividade catalítica. Por outro lado o CLEC requer enzimas com alto padrão de purificação o que o torna mais caro, no entanto essa abordagem provem maior estabilidade térmica e a solventes orgânicos (GUISAN, 2006).

3.3.4 Aprisionamento em matriz

O método de aprisionamento consiste em confinar a enzima em uma matriz formada pela dispersão da enzima em um meio fluido (solução de polímero, por exemplo) por processos físicos ou químicos. Alguns agentes de polimerização mais comuns são: poliacrilamida, amido, alginato, pectato, álcool polivinílico, policarbonato, acetado de celulose, gel de sílica, dentre outros (MONOŠÍK; STREĎANSKÝ; ŠTURDÍK, 2012). As propriedades geométricas das aprisionadas podem ser adaptadas em várias formas, tais como, esferas, filmes, fibras e etc. Uma vez que a

matriz de retenção é formada durante o processo de imobilização, seus precursores e as condições utilizadas devem ser compatíveis com a biomolécula (CAO, 2006).

Em geral, as estratégias de aprisionamento enzima envolvem primeiro, a solubilização enzima em uma solução aquosa do componente da matriz, ou seja, a dispersão de monômeros, géis orgânicos ou a suspensão coloidal de argilas, seguida da eletropolimerização ou reticulação na superfície de um transdutor, permitindo, assim, um melhor controle da configuração da matriz/enzima e em particular, da carga enzimática (COSNIER et al., 2006).

Biossensores que utilizam o aprionamento em matriz como métodos de imobilização geralmente caracterizam-se pelo aumento da estabilidade operacional e de estocagem. Por ser um método menos rígido que a imobilização covalente, o aprisionamento em matriz pode prover maior retenção da atividade enzimática, no entanto podem ocorrer problemas difusionais e de perda da carga enzimática (ZOUROB, 2010; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012).

3.3.5 Encapsulação

O processo de encapsulação baseia-se no aprisionamento da enzima em poros de uma matriz polimérica, sem interação covalente com o suporte. Os poros do suporte devem permitir o acesso do substrato a enzima e a eliminação do produto formado (GUISAN, 2006).

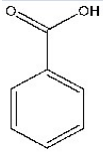
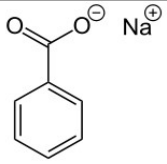
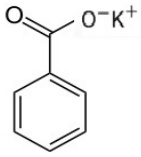
Dentro os métodos de encapsulamento mais amplamente utilizados para imobilização de enzimas em biossensores, está o sol-gel, que se constitui de materiais de sílica porosos e quimicamente inerte que podem ser moldados em qualquer forma, promovendo áreas superficiais específicas extensas com diâmetro de poros controláveis que podem ser adaptados para a dimensão de uma enzima específica, micro (< 2 nm), meso (2-50 nm, sendo os mais utilizados entre para a maioria das enzimas entre 3-6 nm) ou macroporosas (> 50 nm) (BETANCOR; LUCKARIFT, 2008; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009).

Uma das principais limitações da técnica de sol-gel é a baixa eficiência no carregamento de enzima e perda de carga enzimática. O desenvolvimento de variações das técnicas de encapsulamento convencionais podem minimizar tais limitações, como por exemplo a combinação da encapsulação seguida da reticulação por meio de ligações cruzadas (CAO, 2006; BANICA, 2012).

3.4 O analito de trabalho: ácido benzóico e os benzoatos como conservantes alimentícios

O ácido benzóico ($C_7H_6O_2$), ácido carboxílico de massa molar 112,13g/mol é um sólido branco, pouco solúvel em água (2,9 g/L a 20°C) e sua solução aquosa é ligeiramente ácida. O ácido benzóico, assim como seus sais, benzoatos de sódio e potássio, estão entre os conservantes mais utilizados para inibir o crescimento microbiano, em função da relação custo-benefício (Quadro 4) (THERON; LUES, 2010).

Quadro 4 - Algumas características físico-químicas do ácido benzóico e seus sais.

	Ácido benzóico	**Benzoato de sódio**	**Benzoato de potássio**
Fórmula estrutural			
Numero INS[1]	210	211	212
Numero Cas[2]	65-85-0	532-32-1	582-25-2
Fórmula molecular	$C_7H_6O_2$	$C_7H_5O_2$ Na	$C_7H_5O_2$ K
Solubilidade a 20°C	2.9 g/L	566 g/L	566 g/L

Fonte: (WHO, 2005).

De ocorrência natural em animais e plantas, o ácido benzóico, é constituinte de muitos alimentos, como frutas (principalmente oxicoco e ameixas), produtos lácteos, canela, cravo, com relatos de concentrações máximas encontradas de 40 mg/kg de alimento (DAVIDSON; SOFOS; BRANEN, 2010).

Os benzoatos constituem em grupo muito importante de aditivos alimentares para proteger o consumidor dos riscos microbiológicos de algumas bactérias, fungos filamentosos e leveduras enfermidades de origem alimentar, bem como deterioradores de alimentos (BILAU et al., 2008; DEL OLMO; CALZADA; NUÑEZ, 2015).

Uma vez em solução, o ácido benzóico ocorre em equilíbrio entre as formas dissociada e não dissociada e com a diminuição do pH a quantidade de ácidos na forma não dissociada aumenta.

[1] ‘’INS significa International Numbering System ou Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares. Este sistema foi elaborado pelo Comitê do Codex sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes de Alimentos (CCFAC) para estabelecer um sistema numérico internacional de identificação dos aditivos alimentares nas listas de ingredientes como alternativa à declaração do nome específico do aditivo.’.’

[2] Cas Número (*Chemical Abstracts Service Registry Number*). Trata-se do número de registro atribuído a cada produto químico atribuído pelo *Chemical Abstracts Service - CAS*, órgão da Sociedade Americana de Química (*American Chemical Society*-ACS).

Adicionado na forma de seus sais, o ácido benzóico permanece em equilíbrio após sofrer hidrólise (Figura 8) (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

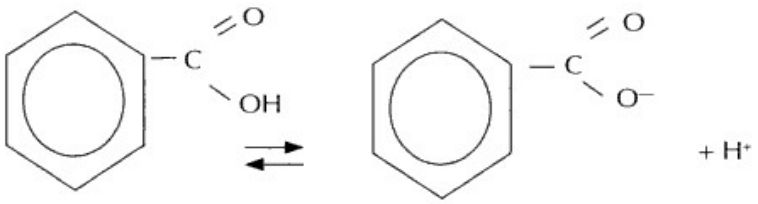


Figura 8 - Hidrólise do ácido benzóico.
Fonte: (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

Embora o ácido benzóico não dissociado seja o agente antimicrobiano mais efetivo, os benzoatos são mais comumente utilizados pela maior solubilidade em água, uma vez que o ácido benzóico é parcialmente solúvel em temperaturas normais (ASHURST, 2005).

O valor do pK para o ácido benzóico é de 4,2. O pK, pode ser definido como sendo o valor do pH em que as concentrações da forma dissociada e não dissociada se igualam, portanto nesse caso, em valores abaixo de 4.2, predomina a forma não dissociada do ácido e em valores acima a forma dissociada (Quadro 5). Desse modo, atua com maior eficiência em alimentos que possuam pH na faixa de 2.5 a 4.5 ou que possam ser acidificados. Tem como maiores mercados de conservantes alimentícios: bebidas não alcoólicas, conservas, geléias, doces, margarinas, balas, molhos (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

As bebidas não alcoólicas contribuem para o consumo estimado de benzoatos representando freqüências superiores a 80% do consumo estimado para o consumidor médio, tornando-as o maior mercado desses conservantes (LINO; PENA, 2010).

Quadro 5 - Percentagem do ácido benzóico não dissociado em função do pH

pK 4.18					
pH	3	4	5	6	7
% de ácido não dissociado	94	61	13	1.5	0.2

Fonte: (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

O ácido benzóico geralmente exibe efeito inibitório no crescimento de fungos e leveduras e em menor escala, de bactérias láticas que são os principais agentes deterioradores de produtos

ácidos, onde os maiores problemas de contaminação ocorrem em faixas de pH acima de 4,5 (THERON; LUES, 2010). Melhores resultados de preservação podem ser obtidos quando o ácido benzóico é utilizado em conjunto com outros conservantes, como o dióxido de enxofre e o ácido sórbico devido aos efeitos sinérgicos (ASHURST, 2005). O aumento do efeito antimicrobiano foi observado quando o benzoato foi combinando com ultrassonicação, irradiação, uso de embalagem a vácuo e atmosfera modificada (ROSS et al., 2003; AUGUSTINE et al., 2013).

O mecanismo de inibição do crescimento microbiano pela fração não dissociada do ácido benzóico, se dá pelo fato deste ser lipossolúvel, o que o torna permeável à membrana celular liprotéica dos microrganismos. Por meio da difusão simples através da membrana, o ácido em equilíbrio após a hidrólise acidifica o meio intracelular (CANOVAS, 1999).

Em geral, os micro-organismos mantém o pH do interior de suas células maior que o exterior. Quando o ácido benzóico entra no citoplasma, a fração não dissociada do ácido sofre dissociação liberando, portanto, íons H^+ e COO^-. Visando manter o pH, a célula promove um fluxo de prótons para o exterior, cuja demanda energética faz com que o crescimento celular seja restringido (Figura 9). Havendo superação das reservas energéticas da célula, o pH do citoplasma diminuirá, afetando negativamente o seu crescimento celular (GOULD, 2000). A neutralização dos prótons por meio de agentes tamponantes celulares causa a acidificação do interior da célula contribuindo para a inibição do crescimento (KREBS et al., 1983).

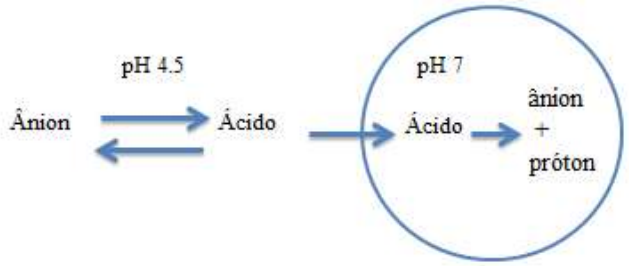


Figura 9 - Teoria clássica da acidificação citoplasmática.
Fonte: Adaptado de (RUSSELL; GOULD, 2003).

O benzoato pode ser considerado o conservante mais efetivo em acidificar o citoplasma. O acúmulo de ânions COO^- no citoplasma, possui efeito antimicrobiano por toxicidade à célula (RUSSELL; GOULD, 2003).

3.4.1 Toxicologia

Uma vez ingerido e em contato com a acidez estomacal, há um deslocamento do equilíbrio que favorece o ácido benzóico não dissociado que é rapidamento absorvido no trato gastrointestinal. No fígado é metabolizado em conjugação com a glicina originando ácido hipúrico que é excretado pela urina. O mesmo ocorre com a ingestão de benzoatos, uma vez que em solução aquosa a forma ionizada origina o ácido benzóico não dissociado. Isso permite que o metabolismo e os efeitos sistêmicos possam ser analizados de forma conjunta (NAIR, 2001; WHO, 2005; SHIBAMOTO; BJELDANES, 2009).

O ácido benzóico assim como seus sais, é considerado um conservante seguro (GRAS-*Generally Recognized as Safe*) para a saúde humana em todo o mundo (DAVIDSON; SOFOS; BRANEN, 2010). Os limites máximos permitidos variam de acordo com a legislação de cada país que os estabelece de acordo com o tipo de alimento (Quadro 6).

Quadro 6 - Concentração máxima de benzoato (expressa como ácido benzóico) em alguns países do mundo.

Concentração máxima de benzoato (expressa como ácido benzóico) em alguns países do mundo		**Referência**
EUA	0.1 %	(FDA, 2013)
México	600 mg/L (bebidas não alcoólicas, xaropes e concentrados)	(CCNRF, 2012)
Brasil	0.05 g/100 mL ou g/100g (bebidas não alcoólicas)	(MAPA, 2007)
União Européia	150 mg/L (bebidas não alcoólicas) 500 mg/L (geléias, produtos de baixas calorias e açúcar)	(EPC, 1995)
Japão	0.6 g/kg (bebidas não alcoólicas e molho de soja) 1 g/kg (margarina) 2.5 g/kg (caviar)	(JETRO, 2011)

A Ingestão Diária Aceitável (IDA) é uma estimativa efetuada pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (*JECFA-Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos Alimentares*), da

quantidade do aditivo alimentar expressa em relação ao peso corporal, que uma pessoa pode ingerir diariamente durante a toda a sua vida sem riscos apreciáveis a sua saúde e é utilizado como critério de avaliação dos aditivivos em todo o mundo (POLÔNIO; PERES, 2009). No caso do ácido benzóico, a IDA é de 0-5 mg/kg (WHO, 2005). No Brasil, o consumo estimado de benzoato para o consumidor médio ficou entre, 0,3-0,9 mg/kg , o que corresponde a 18% da IDA (IBGE) e 54% (Datamark) (LINO; PENA, 2010).

Embora considerados seguros para a saúde, estudos sugerem que o consumo desses conservantes está relacionado a uma série de efeitos adversos a saúde, principalmente em crianças e pessoas suscetíveis (Quadro 7).

A toxicidade aguda de benzoatos é baixa. No entanto, casos de urticária, rinite, asma ou choque anafilático têm sido relatados após exposição oral, dérmica ou por inalação. Em pessoas sensíveis, mesmo em doses inferiores às de 5 mg/kg pode causar reações não imunológicas de contato (pseudo-alergias) (BILAU et al., 2008; SILVA; LIDON, 2016).

Em se tratando dos aditivos alimentares, é importante ressaltar que a toxicidade ou os benefícios, dependem da extensão em que esses componentes alimentares tem a adsorção, excreção e metabolismo como um todo, afetados, uma vez que havendo interações sinérgicas entre eles, os limites para o consumo humano podem ser alterados (MOUTINHO; BERTGES; ASSIS, 2007). Alguns estudos reportam casos de reações alérgicas cruzadas entre os benzoatos e outros aditivos, como o amarelo crepúsculo, por exemplo (POLÔNIO; PERES, 2009), ou com medicamentos como a amoxicilina + ácido clavulânico (MORI et al., 2012).

Quadro 7 - Alguns efeitos adversos relacionados ao consumo de benzoatos.

Possíveis efeitos adversos	Referência
Reações asmáticas	(BALATSINOU et al., 2004; METCALFE; SAMPSON; SIMON, 2008; PARK et al., 2013; BREWER, 2014)
Exacerbação dos sintomas de rinite crônica	(PACOR et al., 2004; ASERO, 2006; WECK; BUNDGAARD, 2012; METCALFE et al., 2013; GIMENEZ-ARNAU; MAIBACH, 2014; SEEDAT, 2015)
Exacerbação dos sintomas de urticária crônica	(POLÔNIO; PERES, 2009; MORI et al., 2012; JACOB et al., 2016; MOWAD et al., 2016)

Hiperatividade em crianças	(EFSA, 2008; METCALFE; SAMPSON; SIMON, 2008; HASHIMOTO, 2011; BEEZHOLD; JOHNSTON; NOCHTA, 2012; AV; ADELOYE; MA, 2015; SALTMARSH, 2015; MOWAD et al., 2016)
Genotoxicidade, clastogenicidade e mutagenicidade (em linfócito humano *in vitro*)	(BRAHMACHARI; PAHAN, 2007; MPOUNTOUKAS et al., 2008; PAHAN, 2011; ZENGIN et al., 2011; ONYEMAOBI; WILLIAMS; ADEKOYA, 2012; PONGSAVEE, 2015; YADAV et al., 2016)

3.4.2 A formação de benzeno em alimentos

O benzeno é reconhecido pelo International Agency for Research on Cancer (IARC-*Agência Internacional de Pesquisa em Câncer*) como carcinogênico do grupo 1 para humanos e seu papel como um leucemogênico foi claramente estabelecido através de uma série de estudos epidemiológicos (IARC, 1987). A ocorrência de benzeno em alimentos tem sido atribuída a diversas fontes potenciais como, por meio de lixiviação de materiais e embalagens ou do ambiente de armazenamento, água de abastecimento contaminada, processos de cocção ou degradação por calor, processos de irradiação em alimentos e degradação de conservantes, tais como os benzoatos (BARSHICK et al., 1995; STADLER; LINEBACK, 2008).

Os benzoatos quando na presença de ácido ascórbico e metais de transição como o Cu (II) e Fe (III), podem sofrer descarboxilação, reação que pode ser acelerada pelo incidência de luz e calor (GARDNER; LAWRENCE, 1993). Metais de transição, por exemplo, Cu (II) e Fe (III), podem catalisar a redução de um elétron de oxigênio por ácido ascórbico para produzir o ânion superóxido, que sofre dismutação espontânea para produzir peróxido de hidrogênio. A redução catalisada pelo metal de H_2O_2 por ácido ascórbico pode gerar o radical hidroxila que pode descaboxilar o acido benzóico, levando a formação de benzeno Tanto o ácido ascórbico, quanto os benzoatos possuem ampla aplicação como antioxidante e conservante, respectivamente, em bebidas não alcoólicas (APREA et al., 2008).

Não existem limites legais estabelecidos para o benzeno em alimentos ou bebidas, sendo o limite na água potável usado como valor de referência, sendo estes limitados a 10 $\mu g/L^{-1}$ pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 5 $\mu g/L^{-1}$ pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) e 1 $\mu g/L^{-1}$ pelo Conselho Europeu (VINCI et al., 2012).

No Brasil, em 2011, o Ministério Público Federal (MPF) firmou um termo de ajustamento de conduta (TAC), com 3 fabricantes de refrigerantes (Coca-Cola Indústrias Ltda., (Companhia de Bebidas das Américas (AMBEV) e a Primo Schincariol Indústria de Cervejas e Refrigerantes Ltda.), que prevê a quantidade máxima de 5 µg/L(MPF, 2011).

Um levantamento com mais de 50 alimentos coletados e analisados de 1991-1992, revelou que os alimentos (incluindo ovos) sem a adição de benzoatos continham benzeno em concentrações < 2 ng/g. A concentração de benzeno em alimentos que continham benzoatos e ascorbatos variou de 1 a 38 ng/g (MCNEAL et al., 1993).

Na literatura, diversos estudos apontam a presença de benzeno acima do permitido pela legislação dos países onde foram realizadas as análises, principalmente em bebidas não-alcoólicas (MCNEAL et al., 1993; BARSHICK et al., 1995; APREA et al., 2008; NYMAN et al., 2008; VAN POUCKE et al., 2008; LACHENMEIER et al., 2010; BONACCORSI et al., 2012; TECHAKRIENGKRAI; LERTBORWORNWONG, 2013).

Diversas pesquisas tem sido realizadas com sistemas líquidos modelos e com amostras de alimentos contendo benzoato de sódio e ácido ascórbico, com o intuito de verificar o potencial de formação de benzeno, bem como a influência de fatores intrínsecos (natureza da matriz alimentícia, pH, concentração de benzoato de sódio e ácido ascórbico, concentração de íons metálicos, ação de antioxidantes e açúcares como quelantes, precursores de hidroxilas) e extrínsecos (temperatura, radiação ultravioleta, tempo de estocagem) ao meio reacional. Adoçantes nutritivos, como açúcar e xarope de milho rico em frutose, o ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) e o hexametafosfato de sódio podem reduzir ou até inibir a formação do benzeno, o que aumenta o potencial de formação em bebidas nas versões *diet* e *light,* já que estas não contêm açucar. A ação quelante do EDTA e do hexametafosfato de sódio, como inibidores da formação de benzeno, pode ser reduzida quando são adicionados cálcio e outros minerais no alimento. Outro fator importante está relacionado com o tempo de estocagem: a formação do benzeno é maior quando são considerados longos tempos de estocagem e altas temperaturas (APREA et al., 2008; NYMAN et al., 2010; CANADIAN BEVERAGE ASSOCIATION, 2011; VINCI et al., 2011; MORSI; EL-TOBGY, 2012).

Em 2006, algumas diretrizes foram publicadas pela Associação Americana de Bebidas (AMERICAN BEVERAGE ASSOCIATION, 2006), na tentativa de auxiliar os fabricantes de bebidas a reduzir ou evitar a formação de benzeno. Dentre elas destacam-se: substituição do ácido

ascórbico por outro antioxidante, uso de EDTA ou polifosfatos de sódio recomendados para seqüestrar íons metálicos que podem catalisar a hidroxila formação radical, avaliação das condições de estocagem e prazo de validade para minimizar a exposição dos produtos a temperaturas elevadas e ultravioleta (UV) (NYMAN, WAMER, et al., 2010).

3.4.3 Métodos analíticos de análises de benzoatos

Tendo em vista a ampla utilização do ácido benzóico e seus sais (benzoatos) como conservantes na indústria alimentícia, a detecção e a quantificação destes são de grande importância no controle de qualidade dos produtos visando evitar fraudes e práticas inadequadas de fabricação, considerando os possíveis efeitos adversos desses conservantes já discutidos na sessão 3.2.1 e formação de benzeno na seção 3.2.2.

Atualmente, o procedimento de análise mais utilizado para detectar e monitorar os níveis de ácido benzóico e benzoatos em alimentos e bebidas é por HPLC *(High-performance liquid chromatography)* em português CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (SHAN, LI, et al., 2008).

No Quadro 8, estão listados alguns dos procedimentos analíticos de HPLC/CLAE utilizados para determinação de benzoatos em alimentos.

Quadro 8 – Resultados de análises de benzoatos em alimentos por CLAE.

Método	Amostras - № total	Concentração	Referências
	Marmelada –11	4 amostras 413,9 – 489,7 mg/kg 7 amostras 509,1 – 1501 mg/kg (> limite permitido)	(FERREIRA et al., 2000)
	Bebidas não alcoólicas – 15 Margarina – 16 Sucos de fruta – 18	média: 225 mg/L média: 276 mg/kg média: 495 mg/L	(TFOUNI; TOLEDO, 2002)
	Sucos de frutas - 156	179-198 mg/kg	(MOTA et al., 2003)

CLAE	Vinho - 46 Sidra - 3	295,6 mg/L em 1 amostra– presença não permitida 608,4 – mg/L em 2 amostras presença não premitida	(MACHADO et al., 2007)
	Sucos de frutas – 11	30,29 – 107,75 mg/L	(ENE; DIACU, 2009)
	Pasteurizado – 24 UHT - 45	0,51-8.8 mg/kg em 11 amostras 0,62-13 mg/kg em 35 amostras 19-110 mg/kg em 27 amostras 11-88 mg/kg em 36 amostras	(Qi et al., 2009)
	Queijo Iogurte	3.17- 56.77 mg/kg 8,94-28.30 mg/kg	(YILDIZ et al., 2011)

3.4.4 Biossensores para determinação de ácido benzóico

A monitorização contínua, sensível, seletiva, e fiável de uma grande variedade de diferentes compostos em várias amostras de alimentos e bebidas é de importância crescente para assegurar a alta qualidade de rastreabilidade de qualquer possível fonte de contaminação de alimentos e bebidas. A maioria dos métodos clássicos de análise utilizados atualmente, embora sejam estabelecidos e confiáveis, necessitam muitas vezes, de instrumentação sofisticada, pessoal bem treinado e tempos longos de análise tornando essas análises de alto custo (MELLO; KUBOTA, 2002; THAKUR; RAGAVAN, 2013). Com o objetivo de tornar as análises de benzoatos em alimentos, mais rápidas, baratas e simples, o desenvolvimento de diversas metodologias é descrito na literatura em termos de biossensores como alternativas promissoras aos métodos convencionais (Quadro 9).

Quadro 9 - Biossensores para detecção de benzoatos/ácido benzóico em amostras de alimentos

Biossensor	**Faixa de detecção**	**Resultados do biossensor**	**CLAE**	**Referências**
PPO-eletrodo de Teflon/grafite	1 – 40 µM	g/mL Refrigerantes:media: 0.17±0.01 pepsi-cola coca-cola	0.152±0.001	(MORALES et al., 2002)

				0.152±0.004	
Tecido de cogumelo homogeneizado	25–100 µM	g/100 mL Limonada 1: 0.033 Limonada 2: 0.033 Limonada 3: 0.034 Bebida de maça: 0.055 Bebida de pêssego: 0.026	% erro - 8 - 6.7 - 1 - 4.8 - 7.8	0.0364 0.0354 0.0344 0.0344 0.0284	(SEZGINTÜRK; GÖKTUG; DINÇKAYA, 2005)
PPO-filme de polianilina-poliacrilamida	Até 20 µM	mg/L Leite: 12.8 ± 0.1 Iogurte: 15.4 ± 0.2 Sprite: 106.0 ± 0.7 Coca-cola®: 110.8 ± 0.8	% erro +5.8 +5.5 −3.1 +2.3	12.1 ± 0.4 14.6 ± 0.3 109.4 ± 2.3 108.3 ± 2.7	(SHAN et al., 2007)
PPO - nanopartículas de CaCO3	0.56–92 µM	Mg/kg Coca-cola®: 130 ± 0.4 Pespsi-cola®: 131 ± 0.5 Sprite®: 113 ± 0.8 Iogurte: 12 ± 0.2	% erro +2.3 +1.5 −7.1 +8.3	127 ± 3.4 129 ± 0.1 121 ± 1.3 11 ± 0.1	(SHAN et al., 2008)
PPO-filme de polianilina	Até 40 µM	mmol/dm^3 Vinagre: 1.54 Vinho de arroz: 3.58 Sprite®: 0.716	% erro −4.3 −4.1 −1.9	1.61 3.44 0.730	(LI et al., 2010)
PPO-$CaHPO_4$	0.03–3 µM	mg/L Coca-cola®: 132 ±3.1 Sprite: 119.6 ±2.5		-	(LÓPEZ; LÓPEZ-RUIZ, 2011)
PPO-poliestireno	100-700 ppm	Ppm Molho de soja: 604.0 ± 10 Molho de ostra: 680.0 ± 5	% erro +1.9 +2.6	592.3 ± 0.8 662.0 ± 16	(HAMZAH et al., 2011)
PPO-titânia gel modificada com nanotubos de carbono multicamada	0.1-2.46 µM	mg/L Bebida: 105.6 ± 2.0	-	109.9 ± 0.1	(KOCHANA et al., 2012)

*Polifenoloxidase (PPO), Carbonato de cálcio (CaCO3), Fosfato de cálcio ($CaHPO_4$).

A enzima tirosinase tem sido utilizada como biocomponente no desenvolvimento de biossensores para determinação de ácido benzóico em amostras de alimentos. Diferentes protocolos de imobilização em transdutores eletroquímicos e mais recentemente, ópticos, têm sido utilizados visando aumentar a estabilidade operacional e de estocagem da enzima e a sensibilidade do método.

Na maioria dos trabalhos relacionados no Quadro 9, a enzima tirosinase comercial foi utilizada. No entanto, no trabalho de SEZGINTÜRK, (2005), o tecido homogenizado do macro fungo *Agaricus bisporus,* imobilizado por reticulação com glutaraldeído em membrana acoplada a um um eletrodo de oxigênio como transdutor, foi utilizado como fonte da enzima tirosinase. A

obtenção de enzimas por meio da utilização de tecidos íntegros ou extratos, confere vantagem econômica em relação a enzimas comerciais, na construção de biossensores.

Não foram encontrados na literatura, trabalhos utilizando o extrato enzimático da tirosinase, obtido de macro fungo *Agaricus bisporus,* na construção de biossensores para ácido benzóico. Tanto o extrato quanto o tecido do macro fungo *Agaricus bisporus*, podem oferecer vantagem econômica frente a utilização de enzimas comerciais purificadas. No entanto, o uso do extrato enzimático em relação ao tecido homogeneizado a partir do macro fungo *Agaricus bisporus*, possibilita a padronização da concentração enzimática necessária ao desenvolvimento do biossensor.

3.5 Biorreceptor de trabalho: enzima tirosinase

3.5.1 Características gerais

A tirosinase [EC 1.14.18.1], também conhecida como polifenol oxidase, é uma enzima bifuncional que contém dois átomos de cobre (CuA e CuB) ambos os quais coordenados por três resíduos de histidina constiuíndo uma proteina de cobre tipo 3 (Figura 10). Estando amplamente distribuída em microorganismos, animais e plantas, a tirosinase está envolvida em processos de melanização da pele, cabelo e escurecimento enzimático de frutas (DECKER; SCHWEIKARDT; TUCZEK, 2006).

A tirosinase do macrofungo *Agaricus bisporus* é intracelular. É uma heterotetrâmero com uma massa molar aparente de 120 kDa aproximadamente, de duas subunidades de 43-48 kDa (H) e duas subunidades de 13,4kDa (L) (WICHERS; GERRITSEN; CHAPELON, 1996) . Possui ponto isoelétrico na faixa de 4,7-5,0. Seu melhor desempenho em termos de atividade se dá na faixa de pH entre 6-8. Geralmente as tirosinases obtidas de fungos possuem propriedades semelhantes (SEO; SHARMA; SHARMA, 2003; HALAOULI et al., 2006; SELINHEIMO et al., 2007).

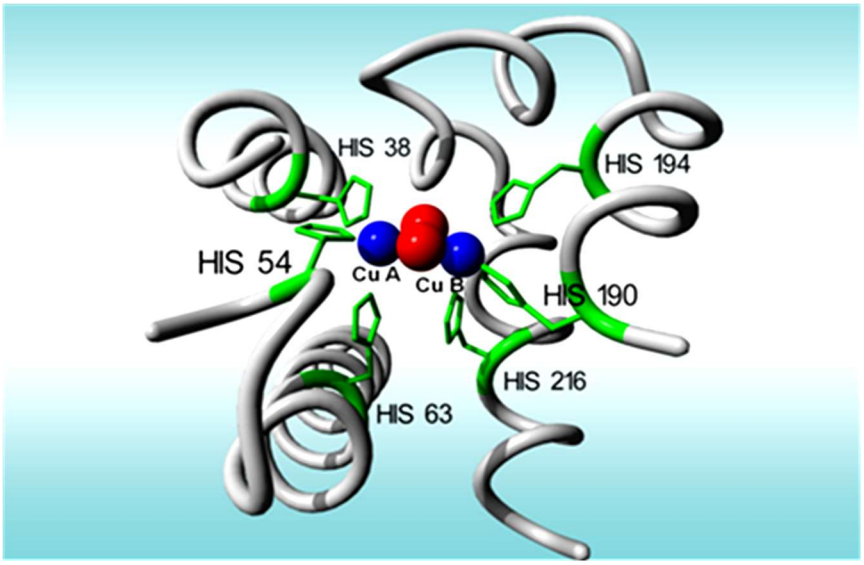


Figura 10 - Estrutura do sítio ativo da tirosinase.
Fonte: (ROLFF et al., 2011).

A tirosinase do macrofungo *Agaricus bisporus* é intracelular. É uma heterotetrâmero com uma massa molar aparente de 120 kDa aproximadamente, de duas subunidades de 43-48 kDa (H) e duas subunidades de 13,4kDa (L) (WICHERS; GERRITSEN; CHAPELON, 1996) . Possui ponto isoelétrico na faixa de 4,7-5,0. Seu melhor desempenho em termos de atividade se dá na faixa de pH entre 6-8. Geralmente as tirosinases obtidas de fungos possuem propriedades semelhantes (SEO; SHARMA; SHARMA, 2003; HALAOULI et al., 2006; SELINHEIMO et al., 2007).

Em 1895 foram realizadas as primeiras investigações bioquímicas com o cogumelo *Russula nigricans*, que após serem cortados e expostos ao ar, adquiriam uma coloração avermelhada passando ao castanho escuro/preto. As tirosinases melhores caracterizadas são derivadas de *Streptomyces glaucescens* e dos fungos *Neurospora crassa* e *Agaricus bisporus.* Em fungos e vertebrados a tirosinase catalisa o primeiro passo para a formação de pigmento melanina a partir da tirosina (WICHERS; GERRITSEN; CHAPELON, 1996).

Utilizando oxigênio molecular, a tirosinase catalisa a reações diferentes: a o-hidroxilação de monofenóis e a subsequente oxidação do o-difenol resultando em o-quinonas (Figura 11). As consecutivas atividades catalíticas da tirosinase são chamadas de cresolase e catecolase, respectivamente. Posteriormente as o-quinonas reagem com nucleófilos diferentes, produzindo intermediários que sofrem polimerização originando pigmentos (melaninas) que vão desde o vermelho até o preto (HAGHBEEN; WUE TAN, 2003; KARBASSI et al., 2003).

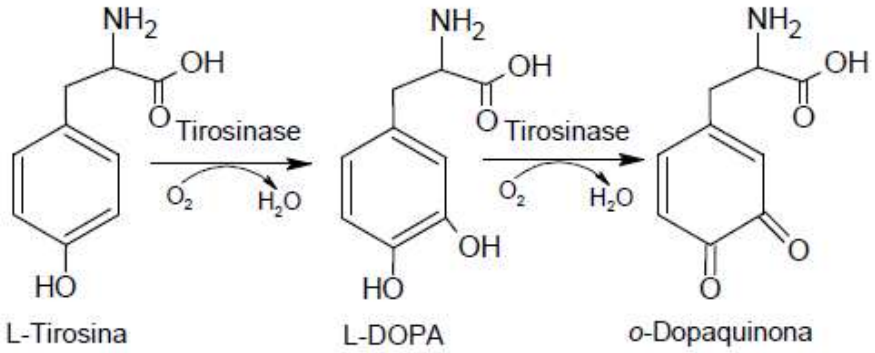


Figura 11 - Esquema simplificado do mecanismo de ação da tirosinase.
Fonte: (HAGHBEEN; WUE TAN, 2003).

O comportamento cinético da tirosinase é muito complexo porque a oxidação enzimática do monofenol e o-difenol e deste para o-quinonas ocorre simultaneamente com reações associadas não enzimáticas destas últimas (FENOLL et al., 2004). O ciclo da monofenóis, tem como particularidade, em relação à cinética da tirosinase, uma fase lag antes de chegar a velocidade máxima. O tempo necessário para atingir o estado estacionário depende de vários fatores: pH, temperatura, a fonte de enzima, a concentração de monofenol (diretamente proporcional ao período da fase lag), a concentração da enzima (com o aumento da concentração de enzima o período lag diminui) e a presença de quantidades catalíticas de o-difenol ou íons de metais de transição (Fe^{+2} ou com menor eficácia, Cd^{+2}, Ni^{+2}, Co^{+2} e Zn^{+2}) que podem eliminar a fase lag completamente. Quanto ao ciclo dos o-difenóis, a cinética segue a de Michaeles-Menten (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1995; FENOLL et al., 2004).

3.5.2 O macro fungo *Agaricus bisporus*

O *champignon* (*Agaricus bisporus*), é uma das espécias de cogumelos mais extensivamente cultivada no mundo sendo a primeira a ser cultivada no Brasil (FURLANI; GODOY, 2005). São organismos pertencentes ao reino Fungi e ao filo Basidiomycota sendo denominados de basidiomicetos. Em geral, apresentam corpo de frutificação macroscópico (basidiocarpo), constituído por hifas entrelaçadas que formam pseudo-tecidos, os quais se diferenciam em pileo,

estipe e lamelas (Figura 7) (KÜES; LIU, 2000). Pertencente à família Agaricaceae, o champignon, constitui um alimento com excelente valor nutritivo devido aos elevados teores de proteínas, vitaminas e fibras e baixos teores de carboidratos e gorduras (FURLANI; GODOY, 2005).

Diversos estudos apontam o *Agaricus bisporus*, como um fungo de grande potencial de degradação sendo utilizado na biorremediação de xenobióticos fenólicos, bem como na construção de biossensores de uso ambiental por ser uma fonte barata da enzima tirosinase (KAMEDA; LANGONE; COELHO, 2006; SANTOS; SILVA, 2013; SILVA et al., 2013b).

Figura 12 - Basidiocarpo do macro fungo Agaricus bisporus

3.5.3 Tirosinase macrofúngicas e suas aplicações

As tirosinases macrofúngicas, geralmente podem ocorrer de diversas isoformas tais como, imaturas, maturas e latentes e ativas, no entanto, a descrição bioquímica em relação à caracterização cinética e relação entre estas isoformas ainda não está bem estabelecida. Os cogumelos apresentam cerca de 99% da tirosinase sob a forma latente (FARIA et al., 2007).

Nos fungos, as tirosinases estão relacionadas ao escurecimento enzimático e à pigmentação. Melaninas fúngicas são derivadas de L-tirosina c-glutaminil-3, 4-dihidroxibenzeno (GDHB) ou catecol no caso dos basidiomicetos e constituem um mecanismo de defesa ao estresse, tais como radiações UV, raios gama, radicais livres, desidratação e temperaturas extremas, além de contribuir para a resistência da parede celular contra enzimas hidrolíticas evitando a lise celular (HALAOULI et al., 2006). Esses pigmentos possuem ainda funções relacionadas diferenciação dos órgãos reprodutivos e formação de esporos,

virulência em fungos patogênicos e proteção dos tecidos após lesão (SEO; SHARMA; SHARMA, 2003).

As reações de oxidação sequenciais catalizadas pela tirosinase descritas na seção 3.3.1, são utilizadas como base para diversas aplicações biotecnológicas que estão resumidas no Quadro 10.

Quadro 10 - Aplicações de tirosinases macrofúngicas.

Aplicação	Princípio/ detecção	Macrofungo	Referências
Determinação de compostos fenólicos	Consumo de oxigênio Redução direta da o-quinona liberada Redução da o-quinona usando um mediador, como o hexacianoferrato	*Agaricus bisporus*	(SILVA; SALGADO; COELHO, 2010) (ÖNNERFJORD, 1995) (BONAKDAR; VILCHEZ; MOTTOLA, 1989)
Determinação de ácido benzóico/benzoatos	Inibição enzimática	*Agaricus bisporus*	(TOPÇU; SEZGINTÜRK; DINÇKAYA, 2004; SHAN et al., 2008b; SANTOS; SILVA, 2013)
Remoção de compostos fenólicos / biorremediação	Oxidação de fenóis	*Agaricus bisporus*	(KAMEDA; LANGONE; COELHO, 2006; DINÇER; BECERIK; AYDEMIR, 2012)
Desenvolvimento de biopolímeros para alimentos	Rede de proteínas ligadas de caseína	*Pycnoporus sanguineus*	(HALAOULI et al., 2006)
Produção de L-DOPA	L-tirosina como substrato	*Aspergillus oryzae*	(IKRAM-UL-HAQ; ALI; QADEER, 2002)

Até a última década, os estudos sobre tirosinases fúngicas, principalmente a partir do cogumelo comestível *Agaricus bisporus*, eram essencialmente motivados pelo fenômeno de escurecimento enzimático durante desenvolvimento e pós-colheita de armazenamento. Hoje, um crescente interesse é dedicado ao potencial das tirosinases fungos em biotecnologia e aplicações ambientais, cenário que propicia a criação de uma grande demanda para a enzima (HALAOULI et al., 2006; FARIA et al., 2007). A tirosinase utilizada por pesquisadores são obtidas comercialmente ou extraídas em laboratório, principalmente a partir dos corpos de frutificação do *Agaricus bisporus* obtidos em mercados locais. Na literatura é possível encontrar estudos que descrevem a utilização da tirosinase a partir do tecido íntegro, extrato enzimático ou tecido homogenizado do corpo de frutificação do macrofungo, senso utilizada em sua forma livre ou

imobilizada (TOPÇU; SEZGINTÜRK; DINÇKAYA, 2004; KAMEDA; LANGONE; COELHO, 2006; SILVA et al., 2013b).

3.6 Extração de enzimas intracelulares: métodos de rompimento celular

A escolha de um método de extração de enzimas depende do tipo de células que contém a enzima e da localização da enzima dentro da estrutura celular. As enzimas denominadas extracelulares são secretadas para fora da célula do organismo produtor, ao contrário das enzimas intracelulares que localizam-se dentro das células no citoplasma ou em compartimentos de organelas (BALASUNDARAM; PANDIT, 2001).

Para a obtenção de enzimas intracelulares são necessários de métodos de extração que promovam o rompimento ou permeabilização da célula (Quadro 11).

Quadro 11 - Métodos de extração de enzimas intracelulares.

Método	Princípio
Ruptura celular	
Pressão	Compressão, cisalhamento
Homogeneização	Cisalhamento, cavitação
Moagem/fresagem	Compressão, cisalhamento
Sonicação	Cavitação
Descompressão	Explosão descompressiva
Congelamento-descongelamento	Cisalhamento
Dispersão aquosa	Choque osmótico
Termólise	Rompimento da parece celular
Permeabilização celular	
Tratamento alcalino	Digestão da parede celular
Tratamento com solvente	Digestão da membrana
Tratamento com enzimas	Digestão da parede celular e choque osmótico
Autólise	Digestão da parede celular e choque osmótico

Fonte: (ILLANES, 2008).

O método de rompimento ideal deve caracterizar-se pela liberação máxima do produto de interesse, não desnaturação térmica ou mecânica do produto durante o rompimento, mínima liberação de proteases que podem degradar o produto, mínima liberação de fragmentos celulares ou contaminantes solúveis que podem influenciar em etapas de processamentos posteriores (GOLDBERG, 1997).

Em geral, enzimas de células e tecidos animais são as mais fáceis de extrair, sendo efetivos métodos brandos de extração, como o choque osmótico, desde que tais células sejam desprovidas de parede celular. O mesmo não ocorre com células de plantas que requerem métodos mais rigorosos, com forças de cisalhamento, devido a sua estrutura rígida formada pela presença de uma camada celulósica (PIERPOINT, 2003). Células microbianas, principalmente de bactérias e leveduras são particularmente difíceis de serem rompidas devido à natureza elástica de seus envelopes celulares (GECIOVA; BURY; JELEN, 2002).

3.6.1 Rompimento celular de fungos

As paredes das células fúngicas são compostas de glucanas, quitina e quitosana, mananos e/ou galactomananos e glicoproteínas. Uma variedade de glucanos , incluindo β-1,3- e β-1,3-/β-1,4-, β-1,6- combinados e α-1,3-glucanos, foram identificados em paredes de células fúngicas (Figura 13) (RONCERO, 2002).

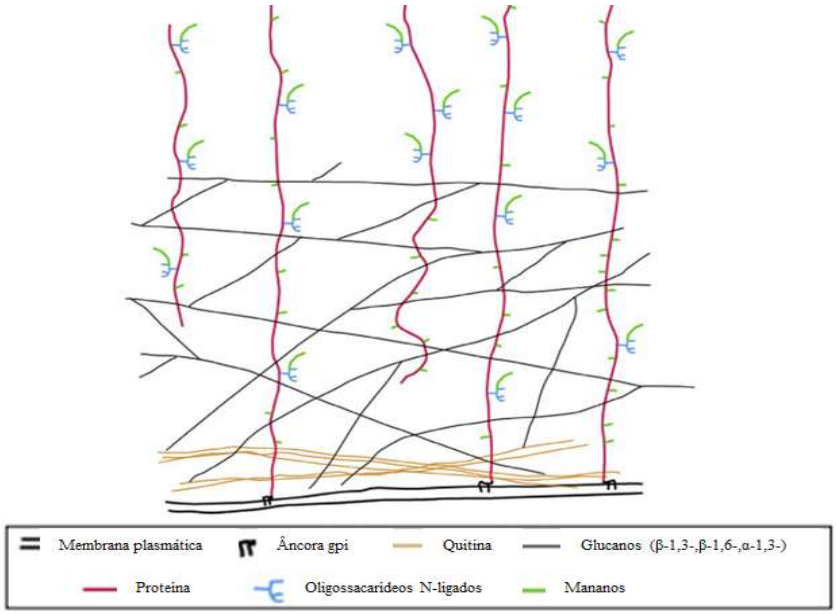


Figura 13- Estrutura básica da membrana celular de um fungo.
Fonte: (FREE, 2013).

Em fungos filamentosos a quitina compõe até 15% da membrana celular. Polímeros de quitina no espaço da parede celular podem participar em intercadeias com ligações de hidrogênio e formar microfibrilas em que as moléculas de quitina são dispostas em um padrão antiparalelo (RUIZ-HERRERA; GONZÁLEZ-PRIETO; RUIZ-MEDRANO, 2002).

Essas microfibrilas têm enorme resistência à tração e contribuem significativamente para a rigidez e a integridade da parede celular (FREE, 2013).

O rompimento das células fúngicas é o passo mais crítico da biologia molecular, enzimologia e bioquímica, devido a sua estrutura filamentosa. A composição da parede celular, sua rigidez e crescimento específico são as principais limitações para a utilização de procedimentos físicos comuns (TASKOVA et al., 2006).

Embora os fungos possam prover uma imensa gama de produtos intracelulares de interesse biotecnológico, procedimentos adequados para o rompimento celular dessas células são relativamente pouco estudados (TASKOVA et al., 2006). A maior parte das metodologias descritas na literatura está voltada para a extração de proteínas de interesse a partir de fungos e leveduras crescidos em meios de cultura líquidos, em laboratório (BRIDGE; KOKUBUN; SIMMONDS, 2004).

A desintegração das células precede o fracionamento e purificação dos constituintes da célula e influencia a qualidade do produto final (KLIMEK-OCHAB et al., 2011). Vários métodos de rompimento celular tem sido desenvolvidos para estabelecer um que seja de baixo custo, eficiente e que promova a liberação efetiva de produtos, de acordo com o tipo de célula que se quer romper e das características do bioproduto desejado (HO et al., 2008; ZHENG et al., 2011).

A aplicação de certas técnicas de desintegração depende das propriedades da célula tais como, a resistência física da parede celular e localização intracelular do produto desejado (KLIMEK-OCHAB et al., 2011).

A utilização de enzimas extraídas de fungos ou microrganismos diversos em alternativa ao uso de enzimas comerciais disponíveis, pode oferecer uma vantagem econômica, nas mais diversas aplicações industriais e tecnológicas. A enzima tirosinase (EC 1.14.18.1), por exemplo, vem sendo utilizada no desenvolvimento de métodos de biorremediação e detecção de compostos fenólicos em amostras ambientais e ácido benzóico em amostras de alimentos e o uso de fontes alternativas dessa enzima, tende a desonerar o desenvolvimentos desses métodos, sem diminuir sua eficácia (SILVA et al., 2013b).

Para a obtenção da enzima tirosinase a partir de corpos de frutificação de macrofungos, os métodos de extração mais utilizados incluem a permeabilização com solventes e congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido (Quadro 12).

Quadro 12 - Métodos de extração da enzima tirosinase a partir de macrofungos.

Fungo	Método de extração	Referência
Agaricus bisporus	Permeabilização com acetona	(PAPA et al., 1994)
Agaricus bisporus	Congelamento de N_2 líquido, homogeneização em cadinho de porcelana, reidratação com tampão fosfato	(ESPÍN; WICHERS, 1999)
Agaricus bisporus (Portobello)	Congelamento em N_2 líquido e homogeneização com tampão fosfato em liquidificador	(ZHANG; FLURKEY, 1997)
Agaricus bisporus (Portobello)	Congelamento em N_2 líquido e homogeneização com tampão fosfato em liquidificador	(FAN; FLURKEY, 2004)
Agaricus bisporus	Permeabilização com acetona	(KAMEDA; LANGONE; COELHO, 2006)

3.7 Purificação parcial de enzimas: métodos de precipitação de proteínas

O extrato enzimático cru, possui além da enzima de interesse, diversos contaminantes. No caso de enzimas intracelulares podem estar presentes: ácido nucleicos, proteínas diversas e outros fragmentos celulares (ILLANES, 2008). Uma etapa de precipitação de proteínas além da remoção de parte desses fragmentos celulares, reduz o volume total do extrato enzimático obtido, possibilitando o controle da concentração da enzima em termos da atividade necessária de acordo com a aplicação. Ajustando-se parâmetros como pH e temperatura, é possível promover uma precipitação seletiva e a remoção de proteínas indesejadas, o que leva a um aumento na atividade específica da enzima de interesse. A precipitação de proteínas constitui uma etapa de purificação parcial de enzimas que antecede os procedimentos cromatográficos de purificação de alta resolução (BHATIA, 2005).

Em relação a enzima tirosinase empregada no presente trabalho, em decorrência da variabilidade inerente aos lotes dos corpos de frutificação do macro fungo *Agaricus bisporus*, as extrações produzem extratos enzimáticos com atividades enzimáticas, variáveis e nem sempre condizentes com as necessidades da aplicação. O uso de técnicas de precipitação de proteínas, pode possibilitar a dimuição do volume, aumento da concentração em termos de atividade enzimática e

consequente controle sobre esta, além da estabilização dos extratos enzimáticos, aumentando a estabilidade de armazenamento.

3.7.1 Sulfato de amônio

Uma das técnicas mais utilizadas para precipitação e concentração de enzimas é a precipitação com o sal sulfato de amônio, devido a sua alta solubilidade, baixo custo, ausência de toxicidade para um número significativo de enzimas, além do efeito estabilizante (PANESAR; MARWAHA; CHOPRA, 2010).

Proteínas solúveis em meios aquosos possuem aminoácidos hidrofílicos de cadeias laterais que podem interagir com a água. Em condições de elevada força iônica, em decorrência da adição de altas concentrações do sal sulfato de amônio, as moléculas da água interagem mais fortemente com os íons produzidos pela dissociação do sal, reduzindo a disponibilidade de água e a solubilidade das proteínas, tornando as interações entre estas, mais forte, possibilitando a formação de agregados e formas precipitadas. Mantendo-se a temperatura baixa o suficiente (em torno de 4°C) a desnaturação irreversível é evitada e o precipitado pode ser redissolvida em solução tampão. Esse fenômeno é conhecido como ‘’salting out’’ (SCOPES, 1994; SHANMUGAM, 2009).

A concentração ideal de sal a ser utilizada precisa ser obtida experimentalmente. Em geral a precipitação sequencial é empregada com concentrações de sal variando de 20% a 100% (Figura 14).

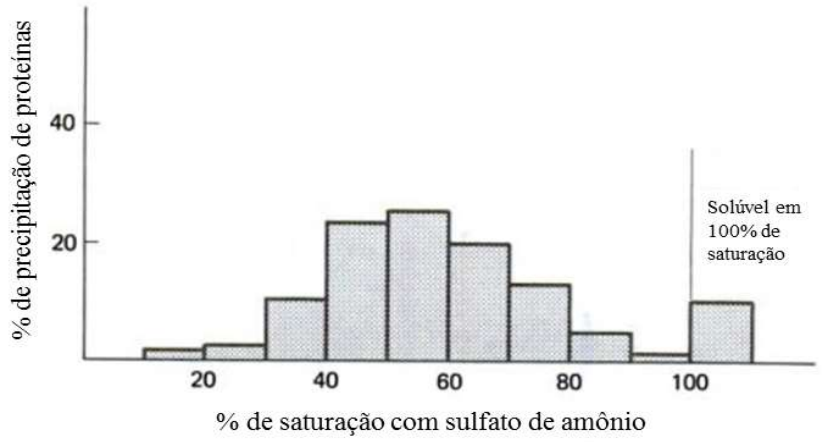


Figura 14 - Perfil típico de precipitação com sulfato de amônio para proteínas de extratos crus.
Fonte: (SCOPES, 1994).

3.7.2 Solventes orgânicos

Algumas enzimas não resistem à precipitação com sais. Uma alternativa ao uso de sais é a precipitação usando solventes orgânicos, como metanol, etanol, acetona e outros. Nesse caso, a presença de solventes reduz a constante dielétrica do meio. O efeito de solvatação das moléculas de água em torno das proteínas diminui e assim como a solubilidade das proteínas, devido ao favorecimento das interações eletrostáticas e dipolares entre proteínas em detrimento das interações solvente-proteína (SCOPES, 1994; AEHLE, 2006).

A precipitação ocorre efetivamente quando o valor do pH da solução é próximo ao valor do ponto isoelétrico da proteína alvo. As proteínas de maior tamanho, precipitam em concentrações menores de solvente, ao contrário de proteínas menores. A temperatura de precipitação com solventes é, geralmente, em torno de 0°C ou menos quando a mistura do meio proteico e do solvente permitir. A adição de solvente orgânico causa a elevação da temperatura do meio, exigindo um rigoroso controle da temperatura. A maioria das proteínas precipitam no intervalo de 20%-50% (v/v) de solvente (ROSENBERG, 2006).

3.7.3 Polímeros orgânicos

Os polímeros orgânicos usados para precipitação de proteínas possuem mecanismo de ação semelhante aos solventes orgânicos (HARRIS, 1992). O polietilenoglicol (PEG) é o polímero mais utilizado em precipitação de proteínas. Solúvel em água, não tóxico e disponível em vários graus de polimerização, é utilizado em baixas concentrações, abaixo de 20% (p/v). Os tipos de PEG mais comumente utilizados são PEG-2000, PEG-4000 e PEG-6000. PEGs de maior peso molar não são recomendados em função da alta viscosidade produzida em soluções aquosas, dificultando a obtenção do precipitado durante a centrifugação (SCOPES, 1994; DENNISON, 2003; ROSENBERG, 2006).

Uma das principais vantagens da utilização do PEG como agente precipitante, em relação aos sais e solventes é o curto tempo requerido para a precipitação. A molécula do PEG pode ser considerada um solvente orgânico polimerizado sendo que o percentual necessário para a precipitação, é menor do que no caso da precipitação usando solventes. A remoção do PEG do precipitado não é facilmente executável como na precipitação com sais ou solventes mas quando

este é utilizado como etapa de purificação que antecede métodos de alta resolução, a remoção pode ser através de etapas cromatográficas subsequentes (HATTI-KAUL; MATTIASSON, 2003).

3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-$CH_3(CH_2)_{11}SO_3^-Na^+$) e um agente redutor (β-mercaptoetanol) é o método mais utilizado para o monitoramento de etapas de purificação de proteínas. Uma vez que o método baseia-se na separação de proteínas de acordo com o tamanho, o método também pode ser utilizado para a determinação da massa molar relativa (Mr) de uma proteína (SHI; JACKOWSKI, 1998).

Sob a influência de um campo elétrico, as moléculas das amostras de proteínas de acordo com a sua densidade de carga, migram na direção do eletrodo de carga contrária. Devido a variação de cargas e massas, diferentes moléculas da mistura de proteínas migram em diferentes velocidades, o que leva a separação da amostra em frações individuais (CHRAMBACH, 1985).

A eletroforese é realizada em um meio suporte (gel) com poros de tamanhos definidos segundo sua composição, que separa as proteínas por carga e tamanho, relacionados as proteínas as quais se pretende analisar. Antes de serem aplicadas no gel, as amostras de proteínas precisam ser aquecidas de 5-10 minutos em tampão contendo o agente redutor, β-mercaptoetanol e SDS (WILSON; WALKER, 2000).

O SDS, é um detergente aniônico que converte a estrutura nativa globular ou terciária fibrosa da proteína roteínas, em uma estrutura linear, a uma razão de 1,4 g de SDS/g de proteína (em media uma molécula de SDS para cada 2 resíduos de proteína para formar complexos carregados negativamente), por meio de grupos SO_3^-, provenientes da ligação entre os hidrocarbonetos do detergente e regiões hidrofóbicas no interior das proteínas (DUNN; BRADD, 1993). As proteínas são desnaturadas por aquecimento na presença do SDS e o agente redutor é empregado para quebar as pontes de dissulfeto. As moléculas do SDS, ligam-se a estrutura da proteína alterando sua forma nativa conferindo extensa carga negativa na maior parte da proteína até que sua forma seja linearizada (WILSON; WALKER, 2000; PALMER; BONNER, 2007).

Dependendo dos tipos de sistemas tamponantes utilizados, a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, pode ser realizada por meio de sistemas contínuos ou descontínuos. No sistema contínuo o gel tem porosidade uniforme e um mesmo tampão é utilizado no gel, nas amostras e na cuba contendo os eletrodos, de modo que as proteínas das amostras

mantém sua conformação nativa e atividade biológica. O sistema descontínuo é composto por dois tipos de gel (gel de resolução/corrida e gel de empilhamento), com porosidades diferentes, além da solução tampão dos géis ser diferente da cuba que contém os eletrodos (LAEMMLI, 1970). A maior vantagem de sistemas descontínuos é que maiores volumes de proteínas diluídas podem ser aplicados no gel e a resolução é maior quando comparada a do método contínuo (LANGEL, 2008).

3.9 O transdutor de trabalho: eletrodo de oxigênio e oxímetro

O oxigênio participa de diversas reações fisiológicas envolvendo oxigenases, hidroxilases e oxidases, sendo este último, o grupo à qual pertence à tirosinase. O eletrodo de oxigênio foi desenvolvido por L.C. Clark em 1953 (Figura 15), o que contribuiu grandemente para os estudos de reações oxigênios-dependentes.

Historicamente, o eletrodo de Clark, foi o primeiro transdutor associado à enzima glicose oxidase pata o monitoramento dos níveis de glicose no sangue, seguindo a atividade da glicose oxidase na presença de glicose e oxigênio (MUTLU, 2010).

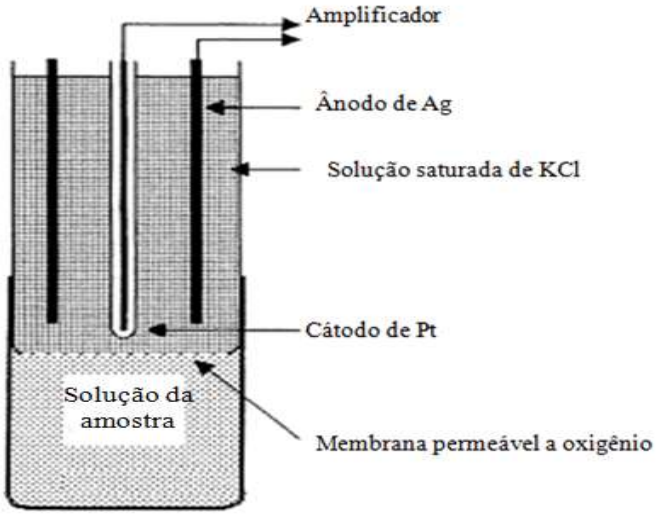
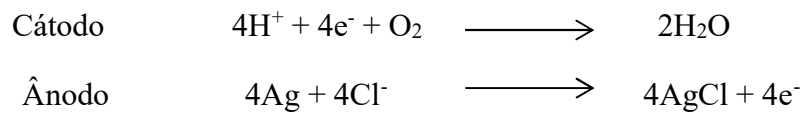


Figura 15 - Esquema do eletrodo de oxigênio do tipo Clark.
Fonte: Adaptado de (BISSWANGER, 2008).

O catodo consiste em um fio de platina fixado em um tudo de vidro, enquanto que o anodo é eletrodo de prata/cloreto de prata, ambos imersos em solução de KCl. A voltagem constante entre os dois eletrodos é de 0.5-0.8 V. Uma membrana de teflon ou polietileno permeável ao oxigênio

separa o eletrodo da solução que contém o analito. A tensão é selecionada fazendo com que o oxigênio seja difundido através da membrana e reduzido no cátodo, criando uma corrente elétrica mensurável. Reações no ânodo e no cátodo do eletrodo de Clark (BISSWANGER, 2013):



A corrente gerada é proporcional a concentração de oxigênio na solução. Antes de ser utilizado o eletrodo precisa ser calibrado simulando-se 100% de umidade (ZHANG; JU; WANG, 2011).

Neste trabalho, esse princípio será utilizado para medir a variação do consumo de oxigênio na reação enzimática na ausência e presença do inibidor ácido benzóico, onde a taxa de inibição da atividade enzimática é proporcional a concentração do analito, no caso, o próprio ácido benzóico.

A reação entre a enzima tirosinase e o substrato L-tirosina ocorre mediante ao consumo de oxigênio (Figura 16).

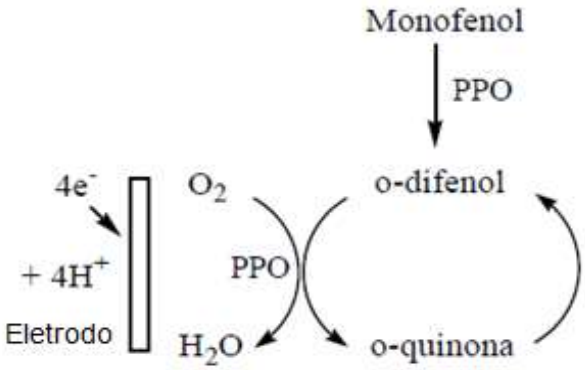


Figura 16 - Reação de catálise de monofenol (L-tirosina) a o-quinona com consumo de oxigênio.
Fonte: (MARQUES; YAMANAKA, 2008).

Na literatura é possível encontrar vários trabalhos onde o eletrodo de oxigênio é utilizado como transdutor na construção de biossensores para área ambiental, alimentícia e clínica (SILVA, 2009; KAMEDA, 2003; SHAN, LI, et al., 2008).

No desenvolvimento de biossensores enzimáticos, as enzimas são imobilizadas na superfície dos transdutores, em geral, eletrodos de carbono vítreo, grafite e outros. Os eletrodos de oxigênio

possuem uma membrana de teflon permeável apenas ao oxigênio. Isso não impossibilita a imobilização de uma enzima diretamente em sua superfície, mas podem ocorrer problemas e difusão por obstrução de parte da área útil da membrana, em função da imobilização. Como alternativa, a enzima pode ser imobilizada em um suporte acloplado ao eletrodo ou na superfície do reator do biossensor, empregando metodologias compatíveis com o material escolhido para a confecção do mesmo.

3.10. As amostras a serem analisadas: bebidas não alcoólicas a base de guaraná

O refresco pode ser definido como uma bebida não gaseificada, não fermentada, obtida pela diluição, em água potável, do suco de fruta, polpa ou extrato vegetal de sua origem, adicionada de açúcares. Os refrescos a base de guaraná, devem conter semente de guaraná (gênero *Paullínia*) ou o seu equivalente em extrato a uma concentração mínima de 0.02 g/100 mL (MAPA, 2009). O consumo de refrescos de guaraná, se tornou um hábito constituindo um mercado de grande importância para a região metropolitana do Rio de Janeiro que é responsável pelo maior consumo de refrescos de guaraná (Figura 17) no Brasil (ABIR, 2011).

	Nordeste	Sudeste	Grande Rio de Janeiro	Grande São Paulo	Interior SP	Sul	Centro-Oeste	Norte	Nacional
Água de Guaraná	21,72	109,65	76,89	43,45	32,06	25,86	25,17	10,00	344,81
Água de Guaraná %	6,3%	31,8%	22,3%	12,6%	9,3%	7,5%	7,3%	2,9%	100,0%
População 2010 (Milhões)	53,11	27,19	11,59	19,60	21,65	27,19	14,40	16,06	190,73
População 2008 (%)	27,8%	14,3%	6,1%	10,3%	11,4%	14,3%	7,6%	8,4%	100,0%
Per Capita Litros/Ano	0,41	4,03	6,63	2,22	1,48	0,95	1,75	0,62	1,81

Fonte: Canadean

Max – Per Capita
Min – Per Capita

Figura 17 - Dados sobre o consumo de refrescos per capita por região de 2005 a 2010.
Fonte: (ABIR, 2011).

Na figura 18 estão ilustrados os dados de consumo per capita de refrescos e bebidas de 2010 a 2014 (litros/habitante/ano):

Ano	Litros/Habitante/Ano	Variação Anual (em %)
2010	1,6	N/A
2011	1,7	6,2%
2012	2,0	12,0%
2013	2,2	11,1%
2014	2,5	13,9%

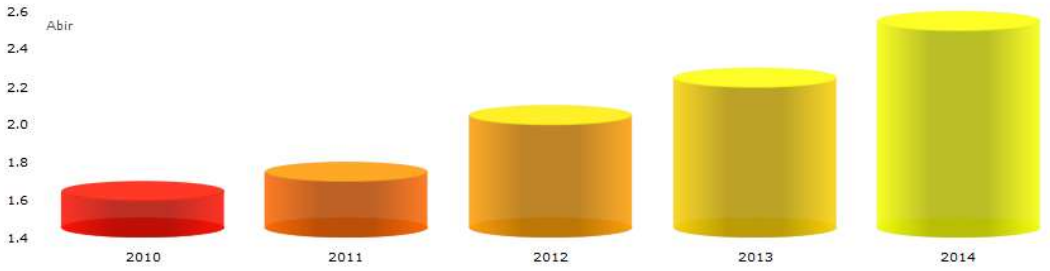


Figura 18 - Consumo per capita do mercado brasileiro de refrescos e bebidas mistas dos anos de 2010 a 2014.
Fonte: (ABIR, 2016)

O conservante mais comumente usado para evitar a proliferação microbiológica nessas bebidas é o ácido benzóico e seus sais (benzoatos de sódio e potássio). A legislação brasileira, para este tipo de produto, permite a concentração máxima de 0.05g do conservante para cada 100 mL de bebida (MAPA, 2007).

Mediante aos dados de consumo apresentados e as possíveis reações adversas do ácido benzóico, além da sua relação com a formação de benzeno, apresentados, respectivamente nas seções 3.2.1 e 3.2.2, evidencia-se a importância do monitoramento desse conservante por meio de métodos que sejam rápidos, simples e eficientes.

4.1 Equipamentos, materiais e reagentes

Durante a execução dos experimentos, foram utilizados:

Equipamentos:

- Balança eletrônica FA-2104N (Bioprecisa)
- Liquidificador industrial (Croydon)
- Bomba a vácuo (Motores elétricos Brasil S/A)
- Estufa de secagem (Quimis)
- Espectrofotômetro Shimadzu UV-1800
- Medidor de pH (Chemcadet)
- Centrífuga (Excelsa 2)
- Centrífuga refrigerada Thermo Scientific Sorvall LYNX
- Espectrofotômetro FENTOM 800X
- Oxímetro e eletrodo de oxigênio DM-4P (Digimed)
- Cuba vertical Mini VE e fonte EPS 301 GE para eletroforese
- Banho termostático TBC
- Evaporador rotativo (Quimis)
- Shaker refrigerado (Quimis)

Materiais:

- Béqueres borossilicato: 5 mL, 10 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL , 500 mL, 1 L e 2 L
- Tubos Falcom 50 mL
- Tubos Polipropileno (PP) Nalgene
- Bastão de borossilicato
- Papel de filtro (filtração rápida) Vetec
- Frascos de vidro âmbar: 50 mL, 300 mL, 500 mL e 1 L
- Frascos de plástico âmbar: 50 mL, 300 mL, 500 mL e 1 L
- Provetas: 5 mL, 50 mL, 100 mL e 250 mL
- Tubos de ensaio 20 cm

- Caixa de isopor 20 L
- Funil de Buchner 400 mL
- Kitassato: 1L
- Balões volumétricos: 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 1L e 2 L
- Membranas de celulose (MM 10000 KDa) (Labdist)
- Membrana de nylon 6,6 45 µm x 47mm

Reagentes:

- Acetona PA ACS Vetec
- Reagente de Bradford Sigma-Aldrich
- L-tirosina Sigma-Aldrich
- Benzoato de sódio E-211 Mapric
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado Vetec
- Fosfato de sódio dibásico anidro Vetec
- Sulfato de amônio Vetec
- Padrão de proteínas: Pré-corado 10-170 kDa Thermo Scientific
- Temed Sigma-Aldrich
- Persulfato de amônio Sigma-Aldrich
- Acrilamida/bisacrilamida 30% Sigma –Aldrich
- SDS (Dodecil sulfato de sódio) Sigma – Adrich
- Tris (hidróximetil) aminometano
- Glicina Sigma – Aldrich
- Azul de bromofenol Sigma – Aldrich
- β-mercaptanol Sigma – Aldrich
- Glutaraldeído 25% Vetec

4.2 Métodos

4.2.1 Extração da enzima tirosinase

A fonte da enzima tirosinase utilizada no desenvolvimento deste trabalho foi o extrato enzimático obtido de corpos de frutificação do macro fungo *Agaricus bisporus* (conhecido popularmente como *''Champignon de Paris''*), adquiridos em hortifrutis da região metropolitana do Rio de Janeiro.

Com o objetivo de suprimir ou substituir o uso do solvente acetona no processo químico de extração enzimática utilizado na metodologia do trabalho anterior (SANTOS, 2012) e aumentar o rendimento em termos de concentração de enzima, foram testadas e comparadas as seguintes metodologias de rompimento celular:

- Combinação de métodos de permeabilização química com dois solventes (acetona e álcool etílico) + congelamento/descongelamento
- Combinação de métodos de permeabilização química com detergente (Triton X-100) + congelamento/descongelamento
- Congelamento/descongelamento como nitrogênio líquido

4.2.1.1 Preparação das amostras do macro fungo *Agaricus bisporus*

Devido à alta variabilidade da composição química dos lotes de cogumelos, a amostra primária referente aos lotes de cogumelos destinados a extração, passou por um processo de diminuição de tamanho dos corpos de frutificação, por meio de um processamento manual seguido da homogeneização das partículas. Este processo visou minimizar a heterogeneidade dos lotes de cogumelos e possibilitar a comparação da eficiência entre os processos de extração testados.

Amostras de massas iguais (500g) foram retiradas aleatoriamente da amostra primária, para serem utilizadas em todas as metodologias de extrações experimentadas em uma mesma data. Os experimentos para cada método de extração foram realizados em triplicata a partir de 3 lotes diferentes de cogumelos.

4.2.1.2 Permeabilização celular com solventes

O procedimento utilizado para realizar a extração química com solventes seguida de etapas de congelamento/descongelamento, foi adaptado do procedimento de Kameda; Langone; Coelho, (2006).

Os procedimentos descritos foram utilizados para a extração com álcool etílico e com acetona.

Em um liquidificador industrial com jarra de inox, foram triturados 500 g de corpos de frutificação de *Agaricus bisporus* com 1 L de solvente gelado. A mistura foi filtrada a vácuo. O resíduo de cogumelo foi congelado por 24 horas. Após descongelamento, o resíduo de cogumelo foi ressuspenso com tampão fosfato de sódio 0.1M pH 6 e congelado por 24 horas. Após descongelamento, o resíduo foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante obtido constitui o extrato enzimático. O precipitado foi ressuspenso com tampão e repetidas as etapas de congelamento/descongelamento e centrifugação. Os extratos foram misturados e armazenados congelados em frascos escuros.

A acetona foi recuperada por evaporação rotativa para reutilização.

4.2.1.3 Remoção de resíduos de solventes dos extratos enzimáticos

O excesso de acetona dos extratos foi removido submetendo os extratos enzimáticos à destilação em um rotaevaporador a vácuo. Foram testadas duas temperaturas (23 °C e 35 °C) e durante 3 horas de evaporação rotativa.

4.2.1.4 Permeabilização com detergente (Triton X-100)

Os de corpos de frutificação de *Agaricus bisporus*, foram triturados com solução de Triton X-100 5% (v/v) em tampão fosfato de sódio pH 6. Após filtração a vácuo o resíduo de cogumelo foi submetido ao mesmo procedimento da permeabilização com solventes (Seção 4.2.1.2). O extrato foi armazenado congelado em frascos escuros.

4.2.1.5 Congelamento/descongelamento com nitrogênio líquido

Em uma caixa de isopor de 10 L, 500 g de cogumelos foram congelados com nitrogênio líquido. O excesso de nitrogênio líquido foi retirado e os cogumelos foram descongelados a temperatura ambiente. A massa de cogumelos foi homogeneizada em liquidificador industrial e submetida dupla centrifugação refrigerada a temperatura de 4 °C, em rotação de 4000 rpm durante 10 minutos. O extrato foi armazenado congelado em frasco escuro.

4.2.2 Concentração do extrato enzimático por precipitação de proteínas

Visando concentrar e padronizar o extrato em relação a atividade enzimática total, foram testados 2 métodos de precipitação sequencial de proteínas utilizando sulfato de amônio e acetona.

Para verificar a eficiência da precipitação em relação à concentração dos extratos enzimáticos, foi calculado o fator de recuperação, dados pela equação:

$$\boldsymbol{FR = \frac{UTr}{UTi}} \qquad \text{Equação 6}$$

Onde, FR: fator de recuperação

UTr: atividade total recuperada

Uti : atividade total inicial

4.2.2.1 Precipitação com Sulfato de amônio

Amostras de 50 mL de extrato enzimático proveniente das extrações com o solvente acetona, foi submetida a precipitação sequencial com sulfato de amônio nos intervalos de 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e de 80-100%, de saturação (SCOPES, 1994).

A precipitação foi realizada com as amostras mantidas em banho de gelo, a temperatura de 0 °C, sob agitação lenta, por 60-90 minutos. Após a solubilização do sal as amostras foram centrifugadas a 9000 rpm a temperatura de 2 °C durante 30 minutos. Esse processo foi repetido para todos os intervalos de saturação. Os precipitados de cada intervalo foram ressuspendidos em 5 mL e armazenados junto com os sobrenadantes, congelados.

Para retirar o excesso de sal sulfato de amônio, os precipitados de todos os intervalos de saturação foram dialisados com membranas de celulose (MM 10000 KDa) em solução tampão fosfato de sódio pH 6, por 24 h a temperatura de 0 °C.

4.2.2.2 Precipitação com Acetona

Amostras de 50 mL do extrato enzimático foram submetidas a precipitação sequencial com acetona nos intervalos de 0-20% e 20%-125% (v/v) de saturação. A amostra permaneceu em banho de gelo, a temperatura de 0 °C, sob agitação por 20 minutos. Depois foram centrifugadas a 9000 rpm a temperatura de 2 °C durante 30 minutos. Os precipitados de cada intervalo foram ressuspendidos em 5 mL de tampão fosfato de sódio pH 6 e armazenados congelados.

4.2.3 Caracterização dos extratos enzimáticos

4.2.3.1 Determinação da atividade enzimática total

A medida da atividade enzimática da tirosinase foi realizada seguindo o procedimento adaptado de CAMPOS et al., (1996).

Um volume de 5.5 mL de solução tampão fosfato de sódio 0.1M pH 6 e 1.5 mL de solução de L-tirosina 1.2 mM foram adicionadas a 1 mL do extrato enzimático diluído dez vezes em mesmo tampão. A mistura foi agitada em agitador vortex por 3s, imediatamente vertida em cubeta de quartzo e levada ao espectrofotômetro para leitura em 280 nm, onde a variação da absorvância resultante da reação da enzima do extrato enzimatico com o substrato L-tirosina, foi em intervalos de 30 segundos durante 870 segundos.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima que provoca o aumento de 0.001 na absorvância a 280 nm por minuto.

Para o cálculo da atividade total (U/mL), a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\boldsymbol{U = \frac{(Abs2 - Abs1)x1000xDE}{(T1 - T2)xVE}} \qquad \text{Equação 7}$$

Onde: Abs_1: absorbância inicial

Abs_2: absorbância final

T_1 : tempo inicial

T_2 : tempo final

V_E : volume de solução enzimática

D_E : fator de diluição da solução enzimática

4.2.3.2 Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas totais dos extratos foi determinada pelo método de (BRADFORD, 1976).

A curva de calibração e análises das amostras dos extratos seguiram o protocolo do método do reagente de Bradford (Sigma-Aldrich)(SIGMA-ALDRICH, 2013). A partir de soluções padrões de BSA (albumina de soro bovino) (0.1-1.4 mg/mL), construiu-se uma curva analítica adicionando-se 3 mL do reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) a 0.1 mL das soluções padrões de proteína em tubos de ensaio que foram agitados em um vortex. Após 10 minutos de reação as amostras padrões foram levadas a leitura em espectrofotômetro a 595 nm (Fentom X 800).

Após a construção da curva analítica, uma alíquota de 0.1 mL dos extratos enzimáticos, previamente diluída dez vezes, em tampão fosfato de sódio pH 6, foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 3 mL do reagente de Bradford e levada a leitura em espectrofotômetro depois de 10 minutos de reação.

O cálculo do teor de proteínas foi feito com base na equação da reta da curva de calibração linear:

$$[\boldsymbol{P}] = \left(\frac{\boldsymbol{Abs-b}}{\boldsymbol{a}}\right).\boldsymbol{FD} \qquad \text{Equação 8}$$

Onde, [P]: concentração de proteínas

Abs: absorbância

FD: fator de diluição

a e b: constantes da equação da reta

4.2.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida os extratos enzimáticos foram analisados, de modo que as diferentes moléculas da sua composição fossem separadas em relação a sua massa molecular. Essa técnica também permite a estimação das massas moleculares da proteína de interesse, no caso desse trabalho, a enzima tirosinase contida nos extratos obtidos a partir do macro fungo *Agaricus bisporus*.

A eletroforese dos extratos enzimáticos em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, utilizando o dodecil sulfato de sódio como desnaturante (SDS-PAGE 12,5%), foi realizada segundo a metodologia descrita por LAEMMLI, (1970). O molde composto por duas placas de vidro e separadores de acrílico, foi preenchido com o gel de resolução (solução de acrilamida 40') até 2 cm da borda superior. Um molde de acrílico em formato de pente foi adicionado para formação de poços para a aplicação das amostras. Após a da polimerização do gel de resolução, o molde foi completado com o gel de empilhamento 30'.

Os géis de resolução e empilhamento foram preparados conforme descritos no Quadro 14:

Quadro 13 - Preparação dos géis de resolução e empilhamento

Gel de resolução 40'	
Acrilamida bisa (30:0,8)	4,125 mL
Tampão Tris-HCL-SDS: 0,75 M/ pH 8	5 mL
Água destilada	0,8 mL
APS (persulfato de amônio): 10% (p/v)	75 µL
TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina)	5 µL
Gel de empilhamento 30'	
Acrilamida bisa (30:0,8)	0,5 mL
Tampão Tris-HCL-SDS: 0,25 M/ pH 6,8	2,5 mL
Água destilada	1.925 mL
APS (persulfato de amônio): 10% (p/v)	75 µL
TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina)	7,5µL

As amostras dos extratos foram preparadas adicionando 20 µL de amostra a 20 µL de tampão Tris-HCl 0.6 M pH 6.8, contendo o agente redutor β-mercaptoetanol. O padrão da enzima tirosinase (Sigma-Aldrich) foi solubilizado em 1 mL de tampão fosfato de sódio 0.1 M pH 6, e uma alíquota de 2 µL adicionada a 20 µL do mesmo tampão das amostras dos extratos. As amostras foram então aquecidas em banho maria por 10 minutos e aplicadas no gel.

O molde com o gel contendo as amostras foi imerso na cuba dos eletrodos, em solução tampão Tris-glicina pH 8.9.

O gel que foi corado com Cromassie Brilliant Blue G-250 e documentado em um MiniBis Pro com o software GelCapture (DNR Bio-Imaging Systems).

A massa molar das amostras foi estimada construindo-se uma curva padrão com as medidas das distâncias percorridas pelas proteínas marcadoras versus o Log de suas massas moleculares. Os cálculos para determinar as massas moleculares das amostras da enzima tirosinase comercial, do extrato enzimático bruto e das frações precipitadas com sulfato de sulfato de amônio, foram efetuados a partir da equação da reta de regressão linear que correlaciona a distância percorrida pelas proteínas marcadoras com os valores de Log da massa molecular:

$$\boldsymbol{LogM = a(D) + b} \qquad \text{Equação 9}$$

Onde, LogM= massa molar

D= distância percorrida pelas amostras

a = constantes da equação da reta

b = constantes da equação da reta

4.2.3.4 Estabilidade de armazenamento dos extratos enzimáticos

A estabilidade de estocagem dos extratos enzimáticos brutos e parcialmente purificados foi avaliada de acordo com o procedimento de determinação da atividade catalítica, descrito na seção 4.2.3.1. Amostras dos extratos brutos e parcialmente purificados oriundos das extrações por permeabilidade com solvente acetona e armazenados a temperatura de - 6ºC, tiveram sua estabilidade de estocagem avaliada mensalmente durante 4 meses . A atividade enzimática dos extratos bruto e parcialmente purificados também foi avaliada em 3 temperaturas de armazenamento: 25°C, 4°C e -6°C, durante 96 horas a cada 24 horas.

4.2.4 Imobilização da tirosinase em diferentes suportes

Uma das etapas mais críticas no desenvolvimento de um biossensor é a imobilização do biocomponente de modo que sua atividade catalítica não seja afetada a ponto de inviabilizar sua utilização na aplicação proposta e ao mesmo tempo prover estabilidade operacional e de armazenamento. Desse modo foram testados alguns suportes (vidro borossilicato, alginato de cálcio recoberto com quitosana, esferas de quitosana e membrana de nylon 6,6) e métodos de imobilização (ligação covalente, ligação covalente cruzada e encapsulamento) visando eleger os mais adequados para a aplicação proposta nesse trabalho.

4.2.4.1 Tubo de vidro borossilicato

Para a imobilização da tirosinase em vidro, tubos de vidro borossilicato foram silanizados por meio da deposição de uma camada de grupos organosilanos. Neste trabalho foi utilizado o composto aminosilano, 3-aminopropiltrietoxisilano (APTS), com o objetivo de formar uma camada de grupos silanos ligados a grupos hidroxila da superfície do vidro, seguida da ativação com glutaraldeído e ligação com a proteína (ZUCCA; SANJUST, 2014).

A silanização foi realizada empregando tubos de superfície lisa sem tratamento adicional e foscos por abrasão mecânica.

A superfície a ser silanizada precisa estar livre de resíduos, sendo para isso empregados métodos de limpeza para a eliminação de contaminantes. A superfície vítrea foi lavada com ácido nítrico 10% (v/v), a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Após lavagem sequencial com solução de acetona os tubos foram submetidos a secagem a 40ºC, por uma hora. Uma solução de 3-aminopropriltrietóxisilano 0.5% (v/v), pH 3.3 a 75ºC, foi adicionada aos tubos, por 3 horas. Após lavagem com água destilada, os tubos foram ativados com glutaraldeído 2.5% em tampão fosfato de sódio 0.1M, pH 7 a temperatura de 25ºC, por 1 hora. Os suportes foram lavados com água destilada para retirar o excesso de glutaraldeído. 5 mL de solução de enzima tirosinase (3000 U) em tampão fosfato de sódio 0.1M, pH 7, foram adicionados aos tubos e incubados sob refrigeração, por 24 horas (MELO et al., 2011).

4.2.4.2 Alginato de cálcio e quitosana

Os suportes de alginato de cálcio e quitosana foram produzidos para imobilização por encapsulamento, seguindo o procedimento adaptado de (RAMADAS et al., 2000). O extrato enzimático (3000 U) diluído dez vezes em tampão fosfato de sódio 0.1 M pH 6, foi misturado ao sal de ácido algínico de algas marrons obtendo-se uma solução 2% (p/v). A solução permaneceu 2 horas sob agitação até total dissolução do alginato. A solução enzimática foi gotejada, com auxílio de uma seringa, a 100 mL de solução de cloreto de cálcio 1.5% (p/v), quitosana 0.3% (p/v) e ácido acético 1% (v/v), em banho de gelo e sob agitação lenta, durante 30 minutos. As esferas foram lavadas, filtradas e armazenadas em água destilada.

4.2.4.3 Quitosana

Esferas de quitosana foram preparadas com base no procedimento modificado de Zhou et al. (2013). Uma massa de 2 g de quitosana de médio peso molar foram adicionados em 100 mL de solução de ácido acético 5% (v/v), sob agitação, por 24 horas. A solução foi gotejada por meio de uma ponteira de plástico de aproximadamente 1 mm, acoplada a uma bomba peristáltica, em 1000 mL de solução de hidróxido de sódio 2 M e etanol (4:1), durante 24 horas, (Figura 19).

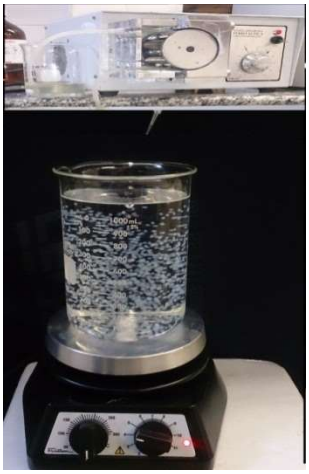


Figura 19 – Preparação das esferas de quitosana

As esferas foram filtradas e lavadas com água destilada até que o pH 7. Uma massa de 10 g de esferas de quitosana foram ativadas com solução de glutaraldeído 0.5% em tampão fosfato de sódio (v/v) por 2h. Após lavagem com água deionizada, a massa de 3 g de esferas ativadas,

adicionou-se o extrato enzimático (3600 U) sob agitação lenta, por 1 h. Em seguida glutaraldeído foi adicionado, obtendo-se a concentração final de 1% (v/v), sob agitação lenta, por 30 minutos. As esferas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de glutaraldeído e enzimas não imobilizadas, seguido do armazenamento em tampão fosfato de sódio 0.1M pH 6 a 4°C.

4.2.4.4 Membrana de nylon 6,6

Para a imobilização da tirosinase utilizando como suporte membranas de nylon 6,6 (0.45 µm, 47 mm, Sigma-Aldrich) foram testados 4 métodos, três com cargas enzimáticas de 5328 U/mL (métodos Covalente 1, Covalente 2 e Adsorção física/ ligação covalente cruzada) e um com carga enzimática de 3600 U/mL (método ligação covalente/covalente cruzada). As membranas foram previamente hidrolisadas com HCl 3M a temperatura de 37.5ºC, durante 2 horas. A cada etapa das imobilizações as membranas foram lavadas com solução tampão 3 vezes (ISGROVE et al., 2001).

- Método Covalente 1): membranas foram ativadas com solução de glutaraldeído 2.5% (v/v), em tampão fosfato de sódio 0.1 M, pH 7, por 2h, adicionado extrato enzimático ao suporte e mantido em contato durante 24h a temperatura de 4°C. Procedimento adaptado de PIALIS; JIMENEZ HAMANN; SAVILLE, (1996).

- Método Covalente 2): membranas foram colocadas em contato com metanol durante 20 minutos a temperatura de 50°C, ativadas com solução de glutaraldeído 2.5% (v/v) em tampão fosfato de sódio 0.1 M, pH 7, por 1h., e adicionado 1mL de extrato enzimático em contato com as membranas durante 24h a temperatura de 4°C. Procedimento adaptado de BRUNO et al., (2004).

- Método Adsorção física/ ligação covalente cruzada): o volume 1 mL do extrato enzimático foi colocado em contato com a membrana por 2h a temperatura de 4°C. Foi adicionado solução de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio 0.1 M, pH 7, para concentração final de 1% (v/v) durante 30 minutos de reação. Procedimento adaptado de BOSHOFF; BURTON; BURTON, (2003).
- Método Ligação covalente/covalente cruzada): membranas foram ativadas em solução de glutaraldeído 0.5% (v/v) em tampão fosfato de sódio 0.1M, pH 7, durante 2 h. Foi adicionado em seguida o extrato enzimático e mantido em contato por 1 h, em seguida

adicionou-se solução de glutaraldeído, obtendo-se a concentração final de 1% (v/v), sendo este mantido por 30 minutos em contato com o suporte e enzima.

4.2.5 Determinação da atividade catalítica da enzima imobilizada e eficiência de imobilização

A atividade enzimática da tirosinase imobilizada foi realizada segundo a metodologia descrita na seção 4.2.3.1, fazendo-se a leitura em modo fotométrico, durante 10 minutos com leitura de alíquotas minuto a minuto.

A eficiência de imobilização foi calculada com base na relação entre a atividade catalítica exibida pela enzima tirosinase imobilizada em relação a carga de enzima aplicada no processo de imobilização, conforme a equação 10:

$$\boldsymbol{n}\% = (\boldsymbol{Us}|\boldsymbol{Ui})\ \boldsymbol{x\,100} \qquad \text{Equação 10}$$

onde,

Us= unidades de atividade enzimática totais presentes no suporte

U_i= unidades de atividade utilizadas na imobilização

4.2.6 Influência da carga enzimática na imobilização com membrana de nylon 6,6

Para avaliar a capacidade de carga da membrana de nylon 6,6 como suporte de imobilização, foram testadas 4 concentrações da enzima tirosinase (1000, 2000, 3000 e 4000 U), para o método de imobilização por ligação covalente seguida da ligação covalente cruzada com glutaraldeído, descrito na seção 4.2.4.6.

4.2.7 Planejamento fatorial para a otimização dos parâmetros da imobilização da tirosinase em membrana de nylon 6,6

Um planejamento de experimentos, fatorial 2^3 com 3 repetições nos pontos centrais totalizando 11 experimentos, foi aplicado para otimizar as condições de imobilização da tirosinase do extrato de *Agaricus bisporus* em membrana de nylon 6,6. Como variável de reposta foi utilizada a atividade enzimática (A_E) da tirosinase enquanto as variáveis independentes, foram, a concentração de gluraldeído para ativação da membrana (x_1), a concentração de gluraldeído para reticulação da enzima (x_2) e o pH (x_3) (Quadro 15).

Quadro 14 - Parâmetros avaliados no planejamento fatorial

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
x_1 GA_1	0,5	1	1,5
x_2 GA_2	0,5	1	1,5
x_3 pH	6	7	8

Membranas de nylon foram hidrolisadas em solução de HCl 3M por 2 horas a temperatura de 35 °C. Após lavagem tripla com água destilada, as membranas foram ativadas com glutaraldeído durante 2 horas sob agitação, a temperatura de 25 °C. Os suportes ativados foram lavados com solução tampão fosfato de sódio 0,1M e postos em contato com 5 mL solução de extrato enzimático (3000 U) durante 15 h a temperatura de 8 °C, sob agitação lenta. Gluraldeído foi adicionado para promover a ligação cruzada enzima-enzima, durante 30 min (Figura 20).

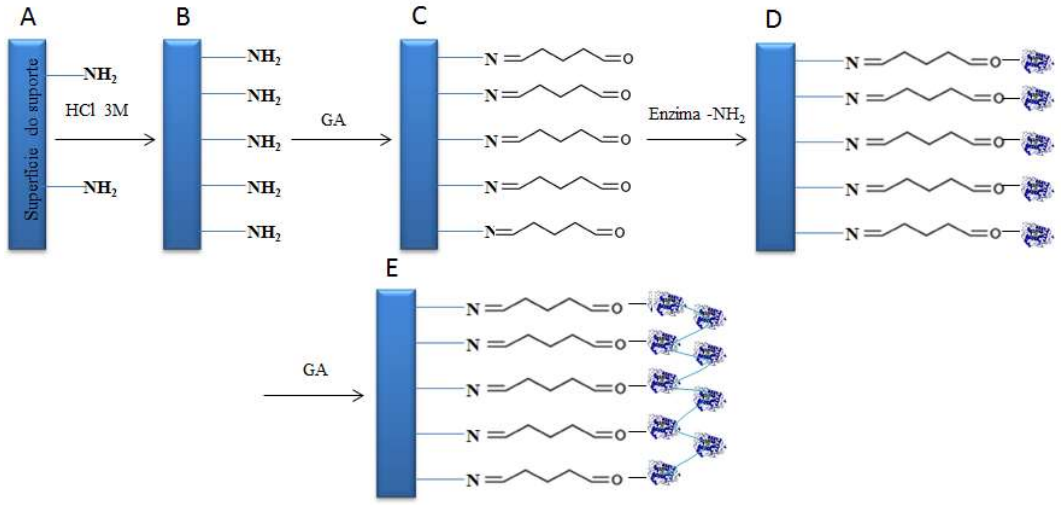


Figura 20 - Representação esquemática da imobilização. A) Hidrólise com HCl 3M, B) Ativação com glutaraldeído (GA), C) Incubação do suporte ativado com o extrato enzimático, D) Enzima do extrato enzimático imobilizada covalentemente no suporte de nylon, E) Reticulação com GA.

As membranas foram lavadas com solução tampão fosfato de sódio 0.1M no pH a ser testado para retirar enzimas não imobilizadas. Os imobilizados foram armazenados, em condições semi-úmidas, sem solução tampão a temperatura de 4°C.

4.2.8 Estabilização da imobilização com borohidreto de sódio

O efeito da redução dos imobilizados com borohidreto de sódio na estabilidade operacional da enzima tirosinase imobilizada foi avaliado utilizando três concentrações (0.25, 0.5 e 1 mg/mL de borohidreto de sódio). As membranas foram imersas em soluções de $NaBH_4$, pH 8, durante 15 min, sem agitação e sob refrigeração (4°C). Após a redução as membranas foram lavadas com solução tampão fosfato de sódio pH 6 e armazenadas a temperatura de 4°C.

4.2.9 Estabilidade operacional da tirosinase imobilizada

Para a avaliação da estabilidade operacional, as membranas contendo a tirosinase imobilizada com e sem tratamento com borohidreto de sódio, foram submetidos a 10 ciclos de reação de 10 minutos cada, com substrato L-tirosina, medindo-se a atividade como descrito na seção 4.2.4.1.

4.2.10 Estabilidade de armazenamento da tirosinase imobilizada

Para avaliação da capacidade de estocagem da tirosinase imobilizada, as membranas foram armazenadas nas condições: sem solução tampão a temperatura de 4ºC (semi-úmida), em solução tampão fosfato de sódio pH 6 a temperatura de 4ºC, e seca a temperatura de - 6ºC . A atividade catalítica foi medida durante 5 dias, a cada 24 horas.

4.2.11 Determinação das melhores condições de desempenho da tirosinase livre e imobilizada

4.2.11.1 Efeito do pH

A atividade enzimática foi medida como descrito na seção 4.2.3.1 para a enzima livre e seção 4.2.4.1 para a enzima imobilizada, em tampão fosfato de sódio 0.1 M em pH 5, 6, 7, 8 e 9 a temperatura de 25 °C.

4.2.11.2 Efeito da temperatura

A atividade enzimática foi medida como descrito na seção 4.2.3.1 para a enzima livre e seção 4.2.4.1 para a enzima imobilizada, em tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 6, nas seguintes temperaturas: 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C e 45 °C, com banho recirculante acoplado a um espectro Shimadzu 1800.

4.2.11.3 Efeito da concentração do substrato e cálculos dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max}

A atividade enzimática foi medida como descrito na seção 4.2.3.1 para a enzima livre e seção 4.2.4.1 para a enzima imobilizada, em tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 6 a temperatura de 25 °C, em diferentes concentrações do substrato L-tirosina, em mesmo tampão, nas concentrações: 0.2 mM, 0.4 mM, 0.6 mM, 0.8 mM, 1 mM, 1.2 mM, 1.4 mM e 1.6 mM.

Foram determinadas as taxas de reação (V_0) nas diferentes concentrações do substrato. Os dados das leituras das absorbâncias pelo tempo de 1 minuto, para cada concentração foram analisados graficamente, e as velocidades iniciais (V_0), obtidas a partir da equação de regressão linear (y=ax+b), sendo a = V_0. Os parâmetros cinéticos da reação enzimática: velocidade máxima, v_{max} (sendo v_{max}=1/b) e a constante de Michaelis-Menten k_m, (sendo k_m=a/v_{max}) foram determinados utilizando o método de linearização de LINEWEAVER; BURK, (1934), descrito na seção 3.1.5.1.

4.3 Constituição, princípio e funcionamento do biossensor

Um reator tubular de batelada com abertura superior (entrada do eletrodo de oxigênio) e lateral (entrada da amostra contendo substrato e inibidor) foi desenvolvido visando a imobilização da enzima tirosinase em sua superfície inferior. O material utilizado foi o vidro devido versatilidade da sua superfície em relação a diversas metodologias de imobilização de enzimas, tanto em um suporte quanto a imobilização realizada diretamente na superfície interna do reator. O biossensor enzimático constitui-se de reator de vidro de 50 mL, contendo uma membrana de nylon com a tirosinase imobilizada (biocomponente) e um eletrodo de oxigênio acoplado a um oxímetro (Digimed DM-4P) (sistema de transdução) (Figura 21).

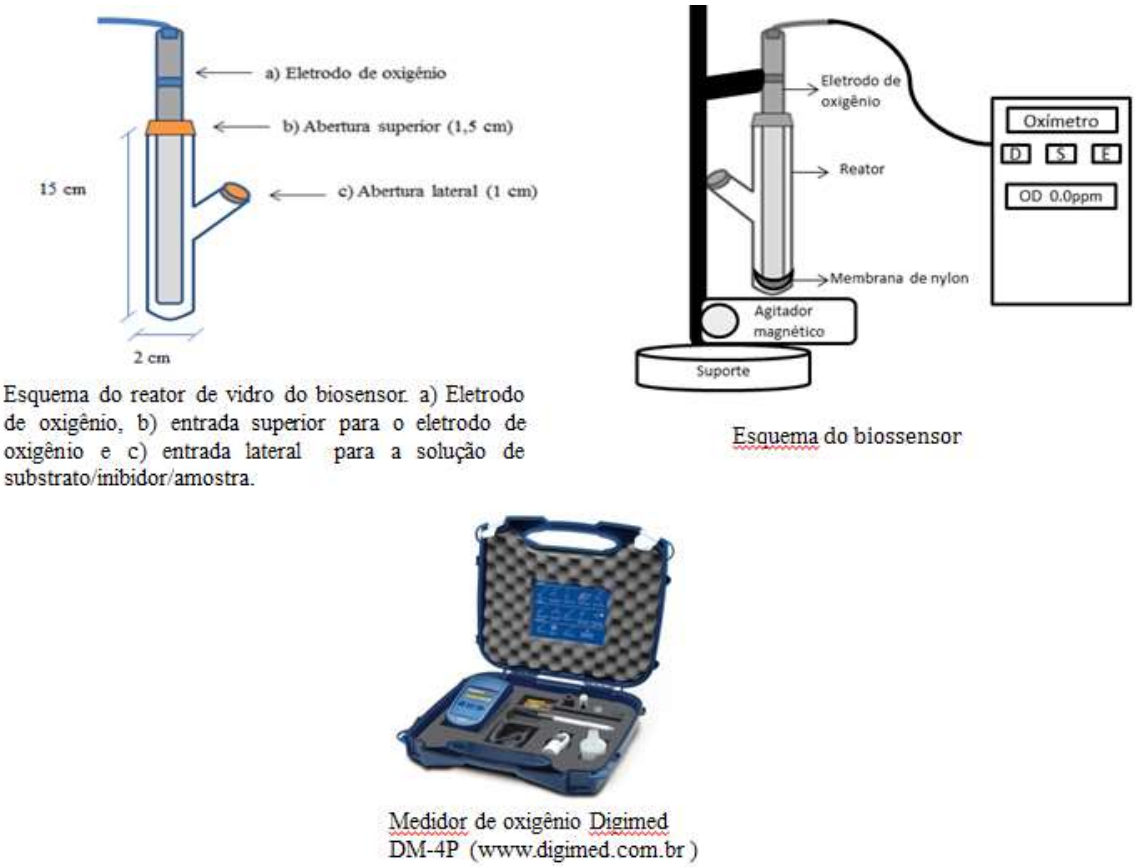


Figura 21 - Representação esquemática do biossensor enzimático.

O biossensor proposto tem como princípio de funcionamento a detecção do ácido benzóico, no caso das amostras reais do benzoato de sódio das amostras de bebidas não alcoólicas a base de guaraná, baseada na inibição da enzima tirosinase.

A tirosinase é uma enzima é uma metaloenzima contendo cobre que catalisa 2 tipos de reações oxigênio-dependente que ocorrem consecutivamente: a orto-hidroxilação de monofenóis para difenóis e a subsequente oxidação de orto-difenóis a orto-quinonas, sendo estas polimerizadas, levando a formação de melanina (GIARDI; REA; BERRA, 2011). O benzoato de sódio é um inibidor competitivo da atividade catalítica da tirosinase. Desse modo o princípio das medidas do biossensor baseou-se na variação do consumo de oxigênio durante a oxidação do substrato na ausência (branco) e na presença de concentrações crescentes do inibidor.

O percentual de inibição foi calculado utilizando a equação:

$$\%I = \frac{\Delta O2\ s/benzoato - \Delta O2\ c/\ benzoato}{\Delta O2\ s/benzoato} x100$$ Equação 11

Onde, % I: percentagem de inibição

ΔO_2 c/ benzoato: variação de oxigênio na presença do benzoato

ΔO_2 s/benzoato: variação de oxigênio na ausência do benzoato

A concentração de benzoato de sódio presente nas amostras é diretamente proporcional ao percentual de inibição sofrido pela enzima tirosinase.

4.3.1 Calibração do sistema de transdução

O eletrodo de oxigênio foi calibrado sempre que aplicado aos ensaios referentes ao desenvolvimento do biossensor. A calibração foi efetuada de acordo com o manual de instruções do equipamento, em 2 pontos padrões, 0% por meio de calibração interna automática e 100% por meio de ar saturado de água mantendo-se a sonda a 1 cm da superfície de água destilada.

4.3.2 Curva padrão de inibição

Para a determinação do percentual de inibição da atividade catalítica da tirosinase, o benzoato de sódio foi o sal de ácido benzóico utilizado nos ensaios por ser o conservante mais comumente empregado como conservante em bebidas não alcoólicas a base de guaraná. As concentrações de benzoato de sódio foram definidas em função da concentração máxima permitida pela legislação brasileira para bebidas não alcoólicas, que é de 0.05 g/100 mL (como ácido benzóico), segundo a ANVISA. A curva de calibração foi composta de limites inferiores (0.01 e 0.03 g/mL), a concentração máxima estabelecida pela legislação (0.05/100 mL) e superiores (0.07 e 0.09 g/mL).

4.3.2.1 Efeito da concentração de substrato na inibição enzimática

Para avaliar o efeito da concentração de substrato na inibição enzimática da tirosinase pelo benzoato de sódio, foram testadas 5 concentrações de substrato para a construção das curvas

padrões: 0.2 mM, 0.4 mM, 0.6 mM, 0.8 mM e 1 mM de L-tirosina em tampão fosfato de sódio 0.1M pH 6.

4.4 Aplicação do biossensor em amostras comerciais

O biossensor enzimático desenvolvido para determinação de benzoato de sódio foi aplicado em amostras comerciais de refrescos a base de guaraná adquiridas no comércio da região metropolitana do Rio de Janeiro e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para efeitos comparativos (SILVA, 2016).

As amostras de guaraná de diversas marcas foram conservadas congeladas até os ensaios. O único pré-tratamento aplicado as amostras foi a correção do pH utilizando solução de NaOH 1N até o pH 6.

5 Caracterização dos extratos enzimáticos

5.1 Atividade enzimática total e teor de proteínas dos extratos

Na tabela 1, estão contidas as atividades enzimáticas totais (U/mL) e específicas (U/mg) e os teores de proteínas dos extratos (mg), resultantes das extrações utilizando os métodos de rompimento celular: acetona/congelamento-descongelamento, permeabilização com Triton X-100/congelamento-descongelamento e congelamento-descongelamento com N_2 líquido.

Tabela 1 - Atividade enzimática e teor de proteínas dos extratos obtidos dos métodos de rompimento celular nos 3 lotes de cogumelos testados.

Método de rompimento celular	Volume de extrato (mL)	Atividade total (U/mL)	Teor de proteínas totais (mg/mL)
Acetona/congelamento-descongelamento	90 ±7,1	2363 ± 64,4	0,51 ±0,01
Triton X-100/congelamento-descongelamento	410 ±14,1	169 ± 22,9	0,11 ±0,01
Congelamento-descongelamento com N_2 líquido	230 ±28,3	63 ± 8,8	0,69 ±0,02

A permeabilização com etanol não foi eficiente a ponto de romper a parede celular fúngica e promover a liberação da enzima tirosinase para o meio extracelular, por esses motivos os extratos resultantes não exibiram atividade enzimática detectável. A extração com permeabilização com acetona combinada ao congelamento/descongelamento em congelador doméstico, produziu os extratos com maiores atividades enzimáticas, nos 3 lotes de cogumelos utilizados nas extrações. Os teores de proteínas desses extratos foram menores que na extração com congelamento/descongelamento com nitrogênio líquido, devido, provavelmente ao rompimento celular parcial ocasionado pela acetona.

A extração com Triton X-100 produziu extratos com altos volumes e baixas atividades enzimáticas, não sendo, portanto, vantajosa frente a relação custo-benefício.

A extração por congelamento/descongelamento com nitrogênio líquido originou extratos com atividades enzimáticas mais baixos do que com a permeabilização com acetona. No entanto, os teores de proteínas desses extratos foram maiores nos 3 lotes de cogumelos utilizados nas extrações, possivelmente devido à presença de uma maior concentração de fragmentos celulares originados pelo rompimento celular total devido ao drástico congelamento com nitrogênio líquido.

A permeabilização com acetona permitiu o controle sobre o volume e concentração do extrato produzido, uma vez que estes estão condicionados ao volume de tampão adicionados nas etapas de ressuspensão. Ao contrário da extração por congelamento/descongelamento com nitrogênio líquido onde o volume de extrato depende da água contida nos corpos de frutificação do macro fungo *Agaricus bisporus*, o que produziu volumes de extratos cerca de 3 vezes maiores que na extração com acetona, conforme os resultados da Tabela 1.

Desse modo, a extração com acetona se mostrou mais vantajosa, devido a produção de extratos com concentrações menores de fragmentos celulares em função de um rompimento celular parcial e, portanto, mais seletivo, além da produção de volumes menores de extrato, o que leva a uma maior relação de custo-benefício da etapa de purificação parcial.

5.1.1 Atividade enzimática dos extratos após remoção de resíduos de acetona

Os resultados das medidas de atividade enzimática das amostras de extratos oriundos de permeabilização celular com acetona estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Resultados das medidas das atividades enzimáticas das amostras de extratos oriundos de permeabilização celular com acetona submetidas a evaporação rotativa.

U/mL das amostras	Temperatura		Δ U/mL
	20°C	35 °C	%
1708 ± 81,32	n.r.	363±45,57	- 78,70
1915 ± 49,50	n.r.	583±96,56	- 69,52
1708 ± 81,32	2102 ± 52,35	n.r.	+ 23,12
1915 ± 49,50	2273±112,56	n.r	+ 18,72

(n.r): não realizado

A remoção de resíduos de acetona realizada a temperatura de 35 °C causou perda de atividade enzimática nas amostras dos extratos 1 e 2 devido, possivelmente, a desnaturação térmica da enzima tirosinase. Por outro lado, as amostras submetidas a evaporação rotativa a temperatura de 20 °C, apresentaram aumento na atividade enzimática devido a remoção de solvente e água das amostras, sendo, portanto, a condição de temperatura mais adequada para a remoção de resíduos de acetona dos extratos.

5.2 Precipitação de proteínas

A precipitação sequencial de proteínas utilizando sulfato de amônio (faixas 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100%, de saturação (p/v) para a temperatura de 0ºC) resultou na obtenção da concentração da enzima tirosinase no intervalo de 40-60%. Nas concentrações menores que essa não foi detectada a presença de tirosinase em testes de atividade com o substrato específico L-tirosina.

Nos ensaios com a acetona como agente precipitante (faixas de 0-20% e 20-125%), a maior precipitação de tirosinase foi no intervalo de concentração de 20-125%, não sendo detectada atividade enzimática no intervalo menor.

Os resultados da precipitação sequencial com sulfato de amônio e acetona das amostras de extratos da permeabilização com acetona, estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados da precipitação sequencial das amostras de extratos da permeabilização com acetona com sulfato de amônio e acetona.

Extrato	Atividade enzimática (U/mL)	Teor de proteínas (mg/mL)	FR (%)
Bruto	558	2,27	100
Sulfato de amônio (40%-60%) de saturação	5286 ±75,6	4,5 ±0,06	94,73
Acetona (20%-125%)	4812 ±149,8	3,8 ±0,08	86,25

O sulfato de amônio apresentou os melhores resultados em termos de concentração da proteína de interesse e recuperação da mesma, que foi cerca de 8% maior que com a acetona. Além disso, dados da literatura apontam o sulfato de amônio como agente estabilizador de proteínas, inibindo a ação de proteases e exercendo efeito bactericida, o que possibilita um maior tempo de estocagem da enzima (ROSENBERG, 2013; SCOPES, 2013).

5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A massa molar da enzima tirosinase dos extratos brutos, parcialmente purificados e da enzima comercial foi determinada por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes.

Segundo, Wichers; Gerritsen; Chapelon, (1996), a enzima tirosinase possui massa molar em torno de 110-120 kDa e ocorre como um composto tetrâmero de duas subunidades de 43-48 kDa (H) e duas subunidades de 13,4 kDa (L), assumindo uma estrutura quaternária H_2L_2.

Pela análise do gel de poliacrilamida, observa-se no poço 2 (tirosinase comercial Sigma), a presença de duas bandas da enzima tirosinase de aproximadamente 12,88 e 51,28 kDa, totalizando uma massa molar de 128 kDa, aproximadamente. Nos poços 3 (extrato bruto), 6 (precipitado 40%-60%) e 7 (precipitado 60%-80%), foram observadas bandas semelhantes de 12,58 kDa e 50,11 kDa, totalizando uma massa molar de 125 kDa, aproximadamente. No entanto, podem ser observadas também outras bandas com pesos moleculares diversos, indicando a presença de outras proteínas contaminantes presentes no extrato (Figura 21).

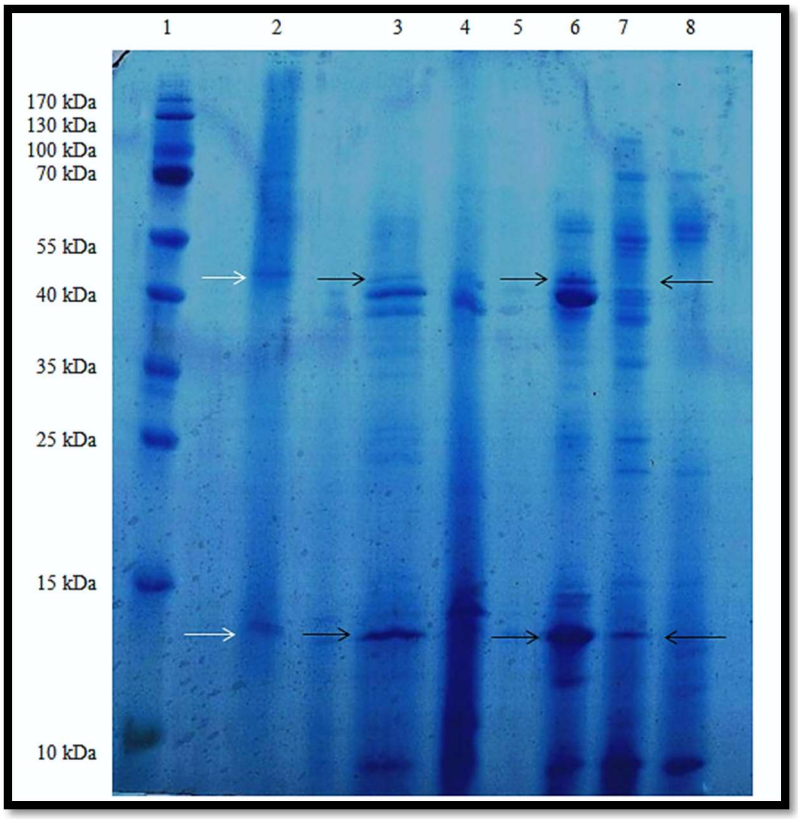


Figura 22 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). (1) Padrões de massa moleculares (kDa), (2) Tirosinase de *Agaricus bisporus* comercial Sigma, (3) Extrato bruto do *Agaricus bisporus*, (4) precipitado da fração 0-20%, (5) precipitado da fração 20-40%, (6) precipitado da fração 40-60%, (7) precipitado da fração 60-80%, (8) precipitado da fração 80-100%.

5.4 Estabilidade de armazenamento dos extratos enzimáticos

Os resultados da estabilidade dos extratos bruto e parcialmente purificado nas temperaturas de 25°C, 4°C e - 6°C, durante 96 horas, podem ser verificados, respectivamente nos gráficos das Figuras 22 e 23.

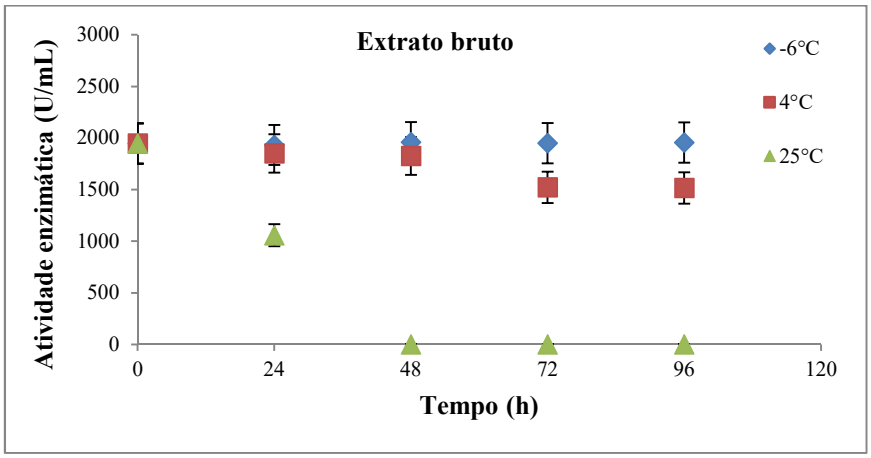


Figura 23 - Estabilidade do extrato enzimático bruto no período de 96 h

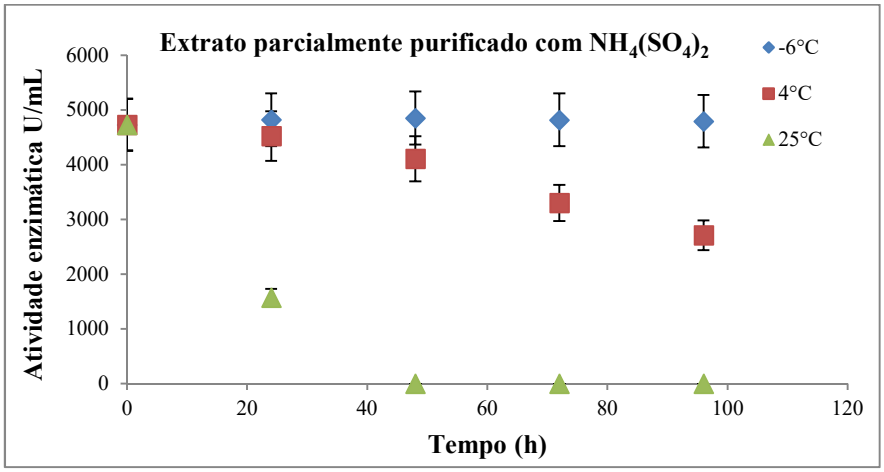


Figura 24 - Estabilidade do extrato enzimático bruto no período de 96 h

A temperatura de 25 °C os extratos se mantiveram estáveis por 24 h, com queda da atividade após esse período para ambos os extratos bruto e parcialmente purificado e perda total da atividade em 48 h. A temperatura de 4 °C os extratos mantiveram suas atividades estáveis por até 24h. A maior estabilidade dos extratos foi com armazenamento a temperatura de - 6°C.

Em temperaturas mais altas, em geral, enzimas tendem a sofrer desnaturação devido ao desequilíbrio entre as diversas interações em sua estrutura, tais como, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, forças de Van der Vaals e pareamento de íons. Em elevadas concentrações de sal e baixas temperaturas enzimas podem ser estabilizadas devido a inibição da ação de proteases e da ação bacteriana em decorrência da redução da atividade de água (GOMES et al., 2007).

A estabilidade dos extratos enzimáticos brutos e parcialmente purificados da extração com acetona foi determinada pelo período de 4 meses (mensalmente) (Figura 24).

O extrato bruto perdeu cerca de 25% da sua atividade inicial, ao final de 4 meses de armazenamento. O extrato parcialmente purificado manteve sua atividade praticamente inalterada durante o mesmo período, fato que se deve a estabilização proporcionada pela precipitação com sulfato de amônio, que previne a proteólise de proteínas e a ação bacteriana, segundo SCOPES, (2013).

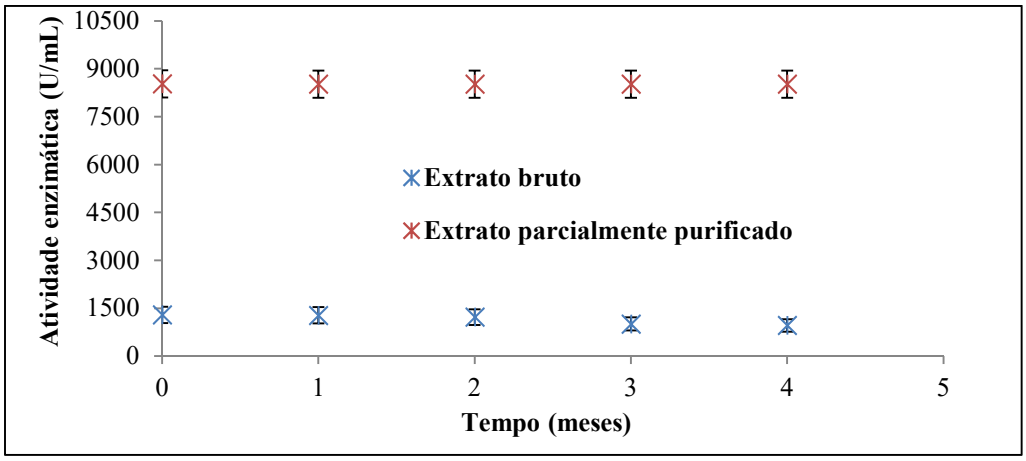


Figura 25 - Estabilidade do extrato enzimático bruto e parcialmente purificado

5.5 Resultados dos métodos de imobilização do extrato enzimático

5.5.1 Eficiência de imobilização

A tabela 4 apresenta os resultados da eficiência de imobilização em relação a atividade enzimática retida pelos suportes e métodos de imobilização testados.

Nas imobilizações utilizando como suportes, tubos de vidros de superfície sem tratamento e fosca por abrasão mecânica, não foi detectada atividade enzimática, durantes 6 minutos de reação entre a tirosinase e L-tirosina, com medidas espectrofométricas, a cada minuto. Aparentemente não

houve adesão da tirosinase do extrato enzimático de *Agaricus bisporus*, na superfície de ambos os suportes. A metodologia utilizada por MELO et al., (2011), para imobilizar lipase em suporte vítreo comercial (esferas de sílica com porosidade de 270 Å), não foi adequada aos suportes de vidro utilizados nesse trabalho.

Tabela 4 - Resultados da eficiência de imobilização (n%) do extrato enzimático nos suportes e métodos testados.

Suporte	Método de imobilização	(n%)
Tubo de vidro liso/fosco	Covalente/silanização (APTS)/GA	Atividade enzimática não detectada
Esferas de alginato de cálcio/quitosana	Encapsulação	Atividade enzimática não detectada
Esferas de quitosana	Covalente/GA	22,5 ±4,03
Membrana de nylon 6,6	Covalente 1	21,17 ±4,42
	Covalente 2	13,23 ±3,71
	Adsorção física/covalente cruzada	42,04 ±6,53
	Covalente/covalente cruzada	61,6 ± 5,22

O encapsulamento de enzimas em suportes de alginato de cálcio além de ser uma alternativa atóxica e de baixo custo, em geral, proporciona um microambiente a enzima imobilizada, semelhante ao da enzima livre, devido a preservação da sua estrutura conformacional e consequentemente da atividade catalítica. Contudo, as principais desvantagens constituem-se da baixa resistência mecânica do alginato na presença de alguns íons, tais como fosfato e citrato e limitações difusionais (LI; BALLADA, 2016).

Na encapsulação utilizando alginato de cálcio/quitosana, o recobrimento dos suportes de alginato de cálcio com solução de quitosana 0,3%, proporcionou resistência mecânica, uma vez que géis de alginato de cálcio possuem alta afinidade com íons fosfato presentes na solução tampão utilizado neste trabalho, o que leva a dissolução das esferas e perda de enzima para o meio extracapsular. No entanto, nenhuma atividade enzimática foi detectada durante 6 minutos de reação e medidas espectrofométricas minuto a minuto. Mas neste caso foi possível verificar a alteração de cor característica da oxidação da L-tirosina pela tirosinase, no interior das esferas, o que sugere a

presença de atividade catalítica da enzima imobilizada. No entanto, devido provavelmente, a limitações difusionais ocasionadas pela porosidade das esferas e acúmulo de substrato/produto em seu interior, houve o impedimento do fluxo de liberação do produto de reação para o meio extracapsular, no tempo de reação testado, não sendo possível a determinação da atividade da enzima imobilizada (MISHRA, 2015).

Na imobilização utilizando suporte de quitosana, a enzima tirosinase foi imobilizada na parte externa das esferas por ligação covalente com grupamentos amino do suporte seguida da reticulação com o agente bifuncional, glutaraldeído (GA). As esferas apresentaram diâmetros entre 1,5 e 1,8 mm (Figura 25).

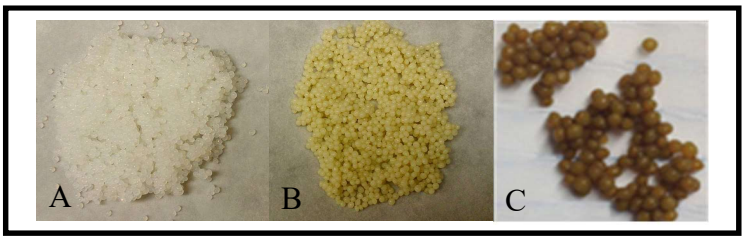


Figura 26 - Esferas de quitosana sem tratamento (a), ativadas com glutaraldeído (b) e após a imobilização da tirosinase por ligação covalente-reticulação (c).

A imobilização na superfície das esferas é uma alternativa as limitações difusionais do processo de encapsulação. No entanto, a eficiência de imobilização utilizando esferas de quitosana apresentou um percentual 3 vezes menor em relação à membrana de nylon 6,6, utilizando o mesmo procedimento de imobilização (covalente/covalente cruzada). A concentração de glutaraldeído utilizada pode não ter sido suficiente para promover a ativação dos grupos amino na superfície da quitosana, ocasionando baixa imobilização da enzima tirosinase e consequente baixa atividade enzimática recuperada (CHEN et al., 2013). No trabalho de Chuang., (2005), a enzima tirosinase purificada foi imobilizada covalentemente em 1 g de esferas de quitosana ativadas com 7,5% de solução de glutaraldeído, o que resultou em 13% de atividade enzimática recuperada.

Comparando as eficiências da imobilização por ligação covalente 1 e 2 da enzima tirosinase extrato de *Agaricus bisporus*, verifica-se que na segunda à atividade recuperada foi menor provavelmente devido a menor tempo de ativação com glutaraldeido o que resultou em um número menor de grupos aldeídos disponíveis no suporte. Já a enzima imobilizada na membrana de nylon 6,6, por adsorção/ligação covalente cruzada, apresentou quase o dobro da atividade retida em

relação ao método de imobilização covalente 1. Embora a ligação covalente promova uma ligação forte entre a enzima e o suporte, as ligações enzima-enzima resultantes da reticulação com glutaraldeído promove maior estabilidade da imobilização, devido a menor perda de enzima por dessorção do suporte, além de maior carga enzimática imobilizada (BARBOSA et al., 2014).

De acordo com os resultados de imobilização descritos na Tabela 1, a imobilização covalente-reticulação foi o método mais eficiente, com 61,6 % de atividade enzimática recuperada em relação à carga enzimática utilizada na imobilização (3600 U), utilizando baixas concentrações de glutaraldeído, mas que foram suficientes para ativar os grupos amino do suporte, gerados pela hidrólise parcial com HCl 3M (Figura 26).

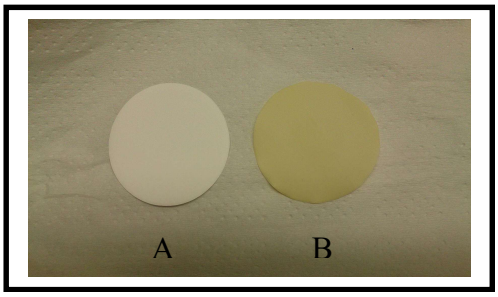


Figura 27 - Membrana de nylon 6,6 sem tratamento (A) e com a enzima tirosinase imobilizada (B)

No trabalho de Boshoff et al., (2003), o extrato parcialmente purificado da enzima tirosinase foi imobilizado por ligação covalente cruzada em membranas de nylon hidratas não hidrolisadas em ácido. O percentual de atividade enzimática recuperada foi de 30%.

Em função deste resultado optou-se por usar a membrana de nylon 6,6 como suporte para imobilização do biocomponente, enzima tirosinase, e método adsorção/ligação covalente cruzada, como método de imobilização. Os ensaios posteriores buscaram a otimização em relação a este procedimento.

5.5.2 Capacidade de carga enzimática da membrana de nylon 6,6

A carga de enzima imobilizada em um suporte é um parâmetro que influencia no seu desempenho. O ideal é que a carga de enzima imobilizada no suporte confira atividade catalítica máxima. A carga enzimática excessiva pode gerar interações enzima-enzima, impedindo a flexibilidade da sua conformação estrutural, causando impedimento estéreo. Com isso, sob condições de aglomeração molar o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima e liberação de

produto são dificultados, reduzindo, portanto, o desempenho catalítico (ZHANG, DONG-HAO; YUWEN, LI-XIA; PENG, 2013).

A avaliação da capacidade de carga da membrana de nylon 6,6 foi avaliada por meio da imobilização de diferentes concentrações de enzima (1000 U/mL, 2000 U/mL, 3000 U/mL e 4000 U/mL). Os resultados são apresentados no gráfico da Figura 27.

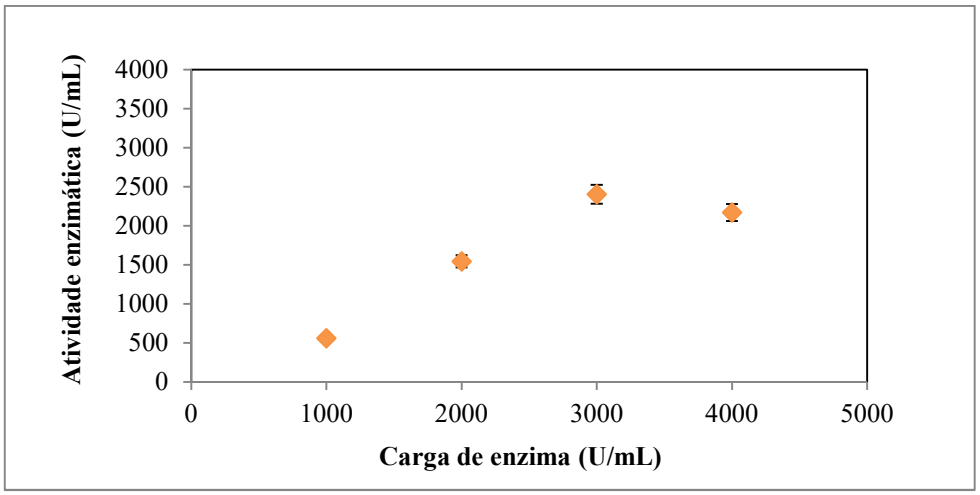


Figura 28 - Desempenho da enzima tirosinase em função da capacidade de carga do suporte de nylon.

A atividade enzimática da tirosinase aumenta da menor concentração testada (1000 U/mL) até atingir o desempenho máximo com carga enzimática de 3000 U/mL. Com carga de enzima de 4000 U/mL, a atividade catalítica cai, indicando problemas de impedimento estéreo devido a aglomeração de proteínas.

5.5.3 Otimização dos parâmetros de imobilização em suporte de nylon

A matrix de planejamento fatorial para avaliação da influência das variáveis (x_1) concentração de gluraldeído para ativação da membrana de nylon, (x_2) concentração de gluraldeído para reticulação da enzima e (x_3) pH e os resultados para a variável de resposta da atividade enzimática, estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Matrix experimental do planejamento fatorial

Ensaios	Variáveis codificadas			Variáveis reais			Reposta
	X_1	X_2	X_3	GA_1	GA_2	pH	U/mL
1	-1	-1	-1	0,5	0,5	6	1256
2	+1	-1	-1	1,5	05	6	1538
3	-1	+1	-1	1,5	1,5	6	1337
4	+1	+1	-1	1,5	1,5	6	1773
5	-1	-1	+1	0,5	0,5	8	1234
6	+1	-1	+1	1,5	0,5	8	1650
7	-1	+1	+1	0,5	1,5	8	1146
8	+1	+1	+1	1,5	1,5	8	1246
9	0	0	0	1	1	7	1682
10	0	0	0	1	1	7	1635
11	0	0	0	1	1	7	1710

Os dados da análise da variância estão sumarizados na tabela 63. O teste de significância estatística foi realizado por meio das réplicas no ponto central.

Tabela 6 - Analises estatísticas. R2 = 0,995; R2ajust. = 0,973

Resultados da análise estatística	P
(1) GA_1	0,007462
(2) GA_2	0,242317
(3) pH	0,027921
1 by 2	0,269836
1 by 3	0,200182
2 by 3	0,017149
1*2*3	0,048281

O modelo matemático proposto descreve de forma satisfatória a atividade enzimática (U/mL) por apresentar R^2 = 0,995 e $R^{2ajust.}$ = 0,973. Apenas os fatores e interações significativos foram incluídos no modelo:

$$A_E = -902.GA_1 - 61.pH + 33.GA_2 .pH - 235.GA_1.GA_2.pH$$

O gráfico de Pareto (Figura 28) em função dos valores da estatística de *t* de Student mostra que a concentração 1 de glutaraldeído (GA_1) e o pH, são os fatores estatisticamente significativos, que isoladamente influenciam na atividade enzimática. A concentração 2 de glutaraldeído (GA_2) não é estatisticamente significativa, mas sua interação com o pH sim.

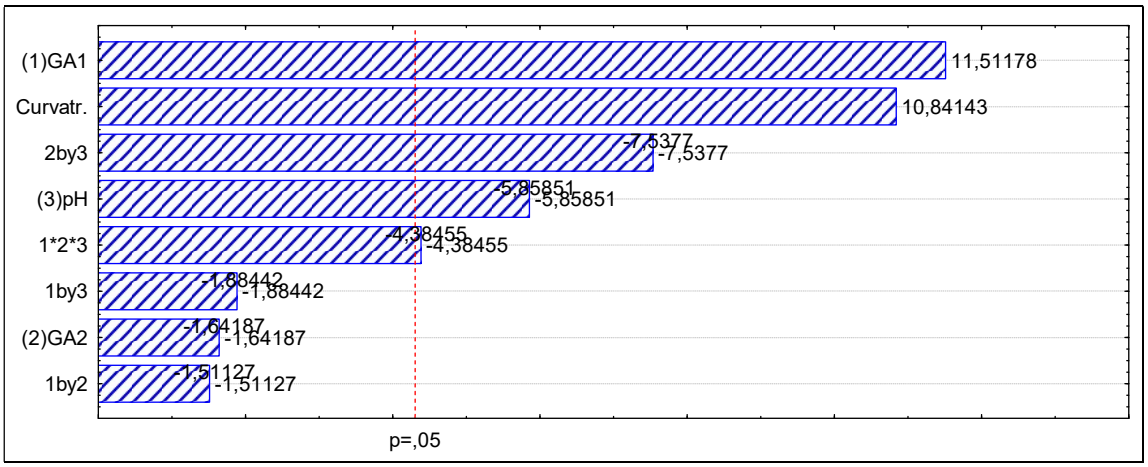


Figura 29 - Gráfico de Pareto para a atividade enzimática da enzima tirosinase imobilizada em membrana de nylon 6, 6, em função dos valores da estatística do teste t de Student.

O gráfico de superfície de resposta (Figura 29) mostra as faixas altas, intermediárias e baixas da atividade enzimática apresentada pela tirosinase imobilizada, em função da concentração de glutaraldeído GA_1 e do pH. É possível verificar que a concentração de glutaraldeído ótima é de 1.5 % enquanto que o pH ótimo é 6.

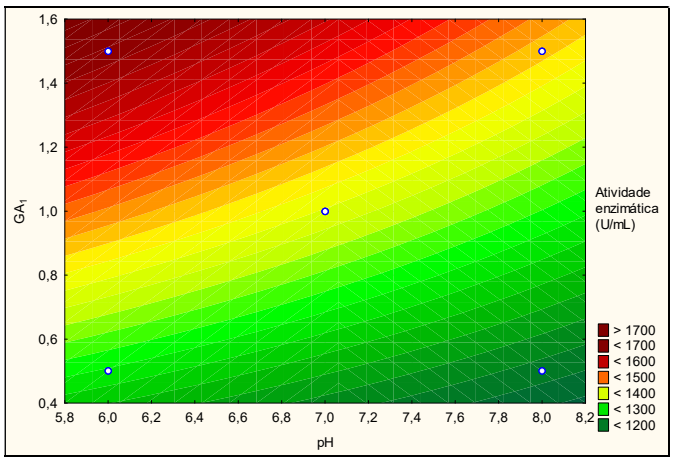


Figura 30 - Superfície de resposta para a atividade da enzima tirosinase imobilizada em membrana de nylon 6,6 em função da concentração de glutaraldeído (GA1) e pH.

O gráfico de superfície da interação GA_2.pH (Figura 30), mostra que o aumento da atividade enzimática da enzima imobilizada com o aumento da concentração de glutaraldeído e com a diminuição do pH.

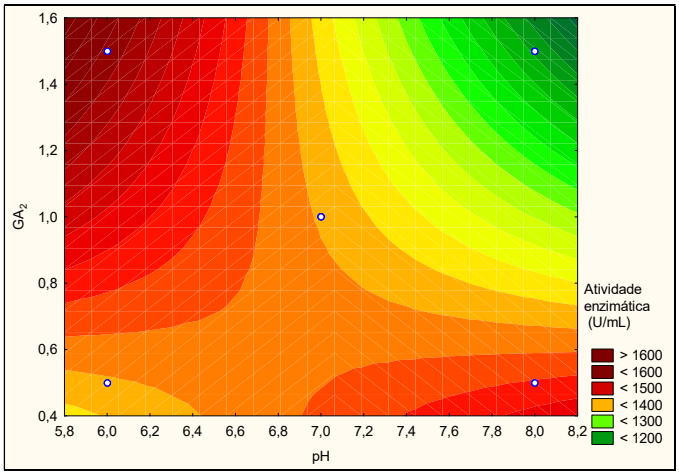


Figura 31 - Superfície de resposta para a atividade da enzima tirosinase imobilizada em membrana de nylon 6,6 em função da interação GA2.pH.

5.5.4 Avaliação da estabilidade operacional com redução por borohidreto de sódio ($NaBH_4$)

Os resultados da redução em diferentes concentrações de $NaBH_4$ das membranas com tirosinase imobilizada em comparação com as membranas não reduzidas, estão apresentados no gráfico da Figura 31.

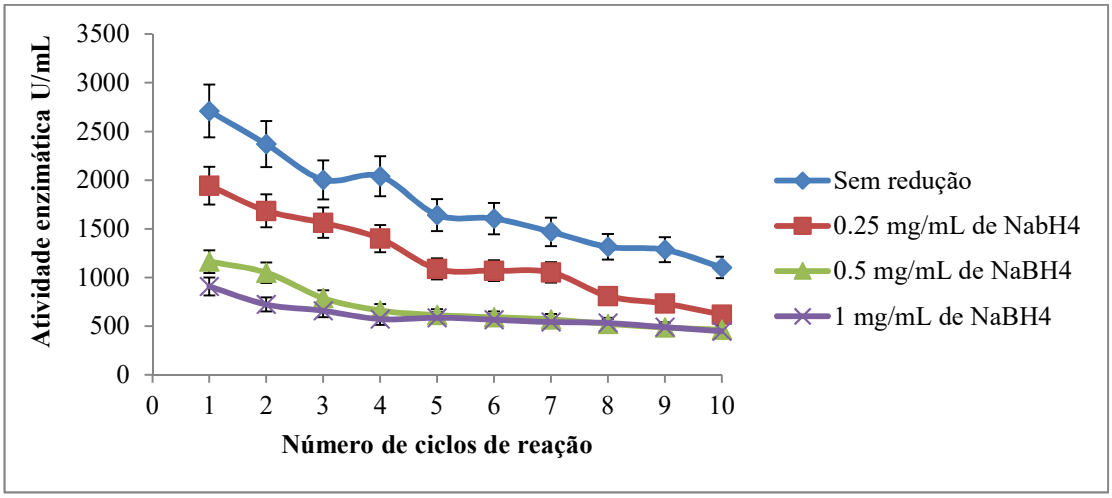


Figura 32- Estabilidade operacional das membranas com tirosinase imobilizada sem e com redução com NaBH4, durante 10 ciclos de reação.

As membranas não submetidas a redução com $NaBH_4$, perderam cerca de 59% da atividade inicial ao longo de 10 reutilizações. As membranas tratadas com 0.25 mg/mL de borohidreto de sódio, perderam cerca de 68% da atividade inicial do primeiro ciclo de reação, o que indica menor estabilidade operacional em relação as membranas não reduzidas com borohidreto. Nas membranas tratadas com as concentrações de 0.5 mg/mL houve perda de atividade ao longo de 10 ciclos de operação de cerca de 60%, o que indica menor estabilidade operacional em relação as membranas não reduzidas. Com a concentração de 1 mg/mL a perda da atividade ao longo de 10 bateladas foi 51% sugerindo aumento de estabilidade operacional em relação as membranas não tratadas, mas drástica redução da atividade medida (1759 U/mL membranas não tratadas, 607 U/mL membranas tratadas com 1 mg/mL de borohidreto de sódio).

Como é possível observar na Figura 30, houve diminuição da atividade enzimática média em todas as concentrações testadas na redução dos imobilizados com borihidreto de sódio, quando comparadas com as membranas sem redução, diretamente proporcional a concentração do $NaBH_4$, indicando que este pode causar danos aestrutura da enzima tirosinase (clivagem nas pontes de dissulfeto e ligações de peptídeos, por exemplo), ainda que na menor concentração testada.

Na literatura estão descritos alguns trabalhos em que o borohidreto de sódio foi utilizado conferindo estabilidade ao imobilizado, mas sempre com alguma perda na atividade da enzima, que em geral, varia de acordo com a natureza da mesma e das condições de redução. No trabalho de CHUANG., (2005), a enzima tirosinase comercial, foi imobilizada em esferas de quitosana e tratadas com 25 mg/mL de $NaBH_4$ em pH 7, sob agitação, durante 1h. A retenção da atividade após a imobilização foi de aproximadamente 12,3% para a imobilização com a redução e de 12,9 % sem redução com $NaBH_4$. Nesse caso houve baixa perda de atividade e aumento na estabilidade operacional e térmica. No trabalho de MIELENZ, (2009), todas as concentrações de $NaBH_4$, utilizadas para a estabilização da lipase em pH 10, promoveram decréscimo da atividade catalítica além de promover o decréscimo da estabilidade térmica e não influir na estabilidade de armazenamento e operacional.

O borohidreto de sódio não foi considerado um redutor adequado para o sistema de imobilização descrito dentro das condições testadas. Além de causar danos ao sítio ativo da tirosina do extrato de *Agaricus bisporus*, ocasionando queda drástica na atividade recuperada da enzima imobilizada, não promoveu aumento da estabilidade operacional.

5.5.5 Estabilidade de estocagem da tirosinase imobilizada em suporte de nylon

A Figura 32, representa os resultados da atividade da tirosinase imobilizada em membrana de nylon 6,6 sob armazenagem 4 dias a temperatura de 4ºC, em tampão fosfato de sódio 0.1M pH 6, e semi-úmida, sem tampão, armazenadas a temperatura de 4ºC e -6 ºC.

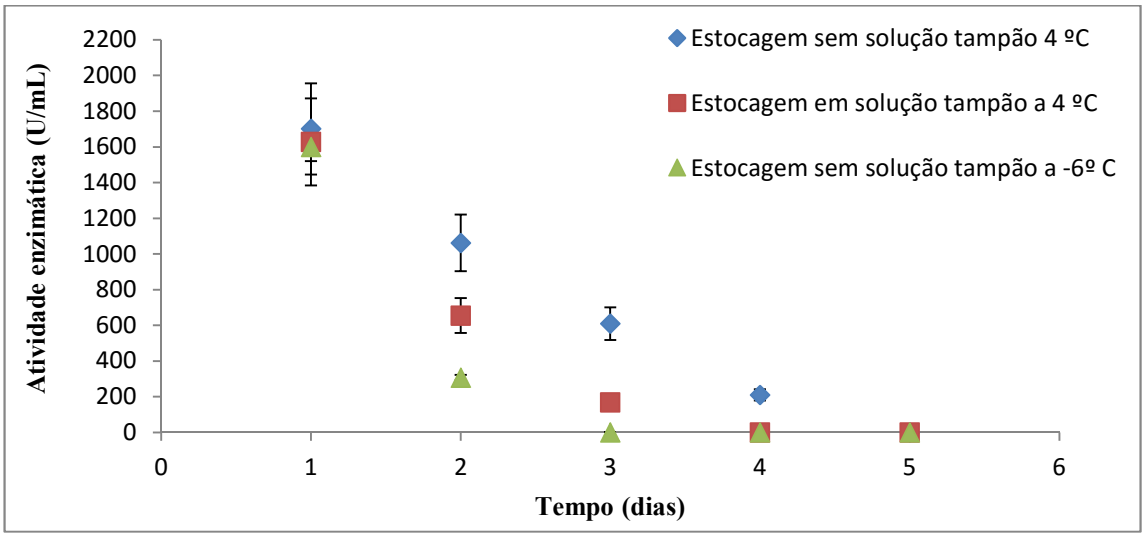


Figura 33 - Atividade da tirosinase imobilizada em membrana de nylon 6,6, durante 5 dias com e sem tampão fosfato de sódio 0.1M pH6.

A tirosinase imobilizada em membrana de nylon estocada sem tampão fosfato de sódio 0.1M pH 6 a temperatura de 4ºC, em tampão fosfato de sódio 0.1M pH 6 a temperatura de 4ºC e sem tampão fosfato de sódio 0.1M pH 6 a temperatura de -6ºC, apresentaram, respectivamente, perda de 39.9% ±2.5, 60,7% ±0,9 e 80.8% ±1,5 nas primeiras 24 horas de estocagem indicando baixa estabilidade de armazenamento nas condições estudadas.

5.6 Resultados das melhores condições de desempenho da enzima tirosinase

5.6.1 Influência do pH

O efeito do pH na atividade enzimática da tirosinase foi determinado realizando-se medidas de atividade em soluções de tampão fosfato de sódio 0,1M de diferentes valores de pH. Os resultados podem ser visualizados na Figura 33.

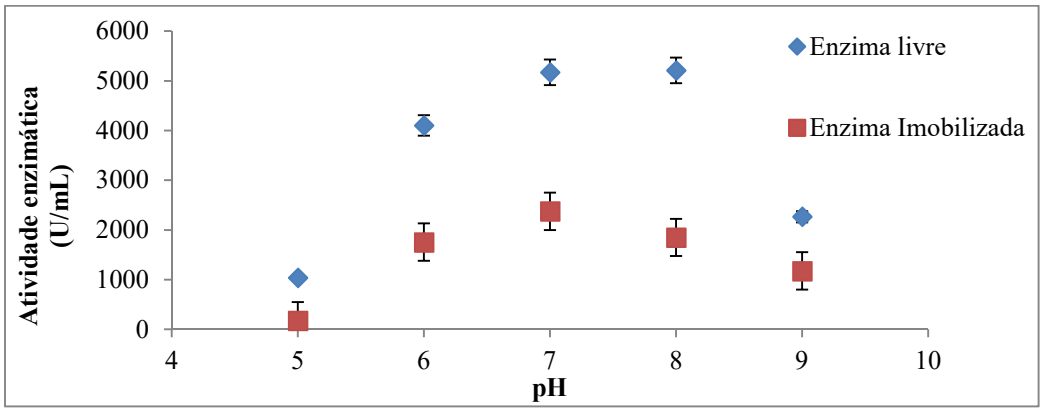


Figura 34 - Influência do pH na atividade enzimática da tirosinase do extrato de *Agaricus bisporus*, livre e imobilizada.

A enzima tirosinase do extrato de *Agaricus bisporus* livre exibiu maior atividade enzimáticas na faixa de pH 7 a pH 8. Para a tirosinase imobilizada o pH de maior atividade enzimática foi o pH 6. No entanto foi possível verificar visualmente que quanto maior o pH para a enzima imobilizada a partir do pH 7, maior o escurecimento da superfície das membranas, quanto maior o valor do pH. Isso provavelmente se deve a formação e deposição na superfície da membrana, de o-quinonas resultantes da oxidação do substrato e subsequente formação de melaninas que podem causar a inativação da enzima (Figura 34) (MUNJAL; SAWHNEY, 2002).

Além disso, as amostras a serem analisadas pelo biossensor proposto (bebidas não alcoólicas a base de guaraná), possuem pH abaixo de 5. Portanto, o pH 6 foi escolhido como o de trabalho para o extrato enzimático.

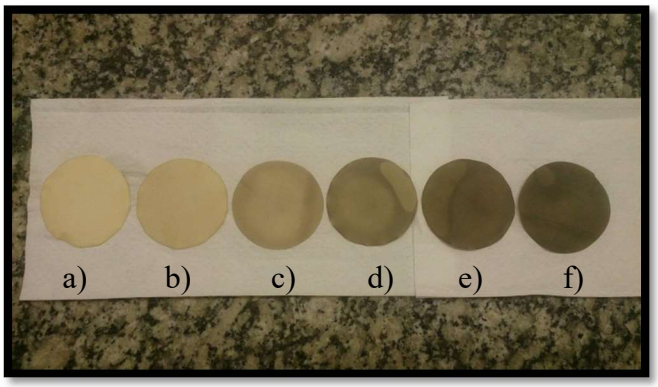


Figura 35 - Membranas contendo tirosinase imobilizada, na sequência: a) membrana com tirosinase imobilizada não submetida a reação com solução de substrato, b) reação com solução de substrato pH 5, c) reação com solução de substrato pH 6, d) reação com solução de substrato pH 7, e) reação com solução de substrato pH 8, f) reação com solução de substrato pH 9. Todas as reações foram realizadas utilizando tampão fosfato de sódio 0.1M.

5.6.2 Influência da temperatura na atividade de enzima

De acordo com o gráfico da Figura 35, a atividade da enzima tirosinase livre atingiu o maior valor na temperatura de 35 °C, enquanto que a enzima imobilizada apresentou melhor desempenho catalíco na temperatura de 30 °C.

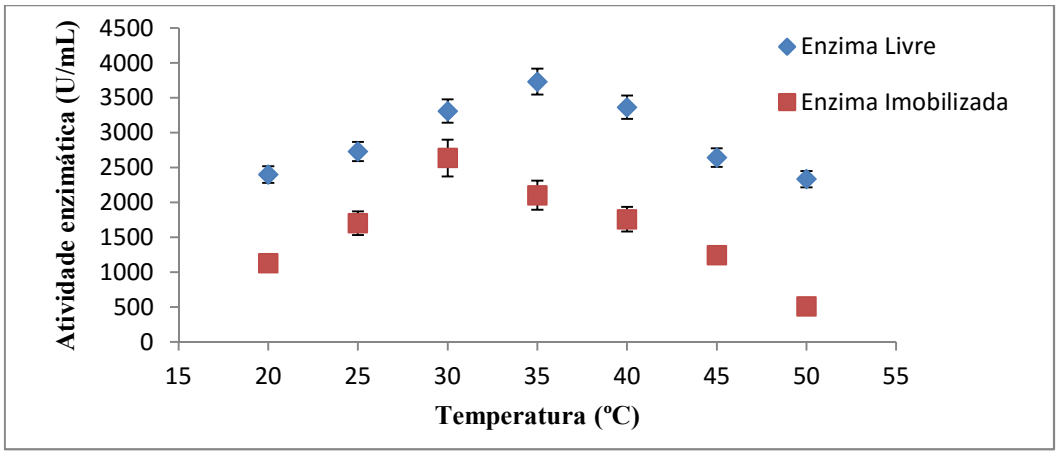
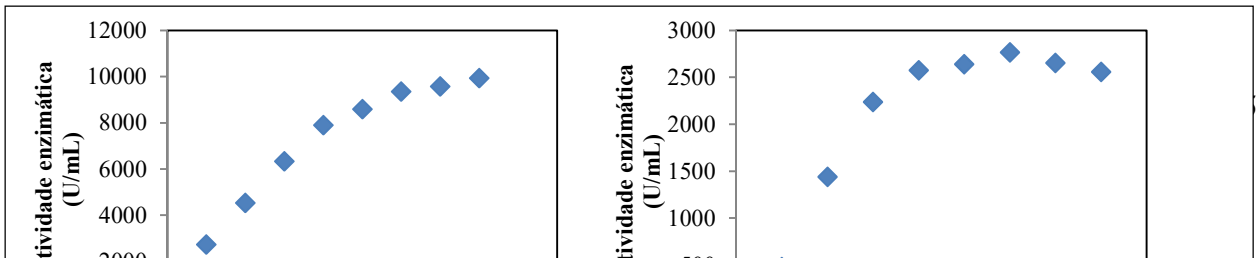


Figura 36 - Influência da temperatura na atividade enzimática da tirosinase do extrato de *Agaricus bisporus*, livre e imobilizada.

Como visto na seção 5.1.2, a enzima tirosinase apresentou perda de atividade catalítica de até 78%, quando submetida a temperatura de 35 °C por um período de 3 horas, em rotaevaporação para eliminação de resíduos de acetona do processo de extração. Desse modo, a temperatura de trabalho escolhida foi de 25 °C visando a maior estabilidade térmica da enzima tirosinase.

5.6.3 Influência da concentração do substrato na atividade de enzima livre e imobilizada: cálculos dos parâmetros cinéticos da enzima livre (km e Vmax)

A influência da concentração do substrato na atividade enzimática da tirosinase livre e imobilizada foi medida variando-se as concentrações do substrato L-tirosina (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 e 1.6 mM) (Figura 36).



A B

Figura 37 - Influência da concentração do substrato L-tirosina na atividade enzimática da enzima livre (A) e imobilizada (B).

Os parâmetros cinéticos foram obtidos pelo método de Lineweaver-Burk, onde construiu-se um gráfico de 1/[s] versus $1/v_0$, (Figura 37).

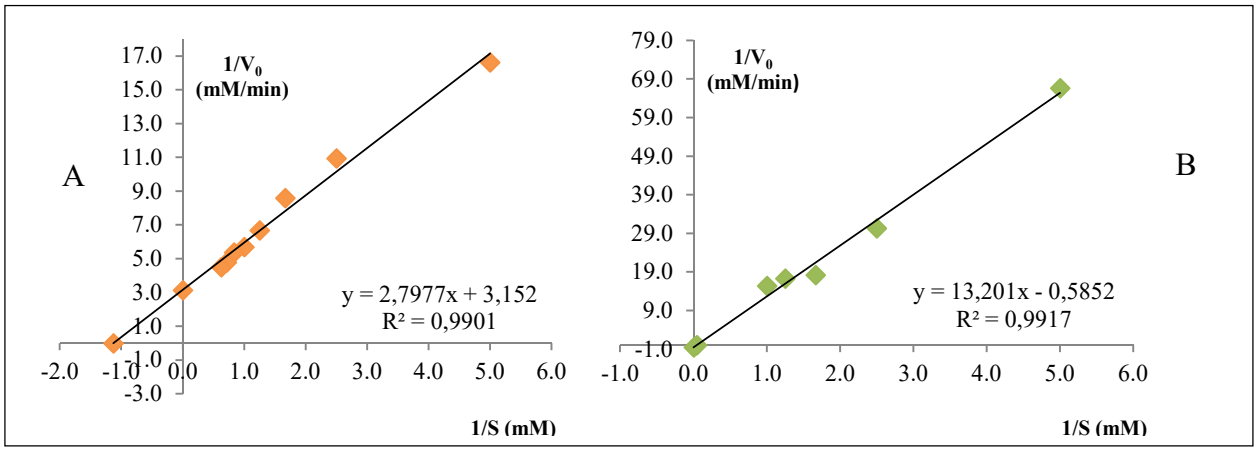


Figura 38 - Gráfico de 1/[s] versus $1/v_0$, segundo o método de Linearweaver-Burk. (A) enzima livre e (B) enzima imobilizada.

Os valores de k_m e v_{max} para a enzima livre e imobilizada foram sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7 - Constantes cinéticas para a enzima tirosinase comercial livre, tirosinase de extrato de *Agaricus bisporus* livre e tirosinase do extrato de *Agaricus bisporus* imobilizada em nylon 6,6.

Tirosinase	**K_m (mM)**	**V_{max}**	**Ref.**
Comercial (livre)	0.5	-	(SIGMA-ALDRICH, 2013)
Extrato de *Agaricus bisporus* (livre)	0.88	0.32	Presente trabalho
Extrato de *Agaricus bisporus* (imobilizada)	7.73	1.71	Presente trabalho

Para a enzima do extrato de *Agaricus bisporus* foram encontrados os valores de k_m equivalente a 0,88 mM e de v_{max} 0,32 mM/min/mL de enzima. De acordo com o as informações da SIGMA-ALDRICH, o valor de k_m para a enzima tirosinase comercial purificada é de 0.5 mM para o substrato L-tirosina. No trabalho de ESPÍN et al., (2000), onde a enzima comercial purificada da SIGMA-ALDRICH, passou por processo de purificação adicional, o valor de k_m para o mesmo substrato foi de 0.2 mM e a v_{max} 1.8 µMol/min. FENOLL et al., (2000), encontraram valores de k_m igual a 0.21 mM e v_{max} igual a 0.23 µMol/min, para a enzima tirosinase de cogumelo da SIGMA-ALDRICH, que passou por um processo adicional de purificação. A partir desses dados, pode-se concluir que quanto maior for o fator de purificação de uma enzima, menor será o seu valor de k_m e consequentemente, maior será a afinidade entre a enzima e o substrato.

Para a enzima tirosinase do extrato de *Agaricus bisporus,* parcialmente purificado, imobilizada, foram encontrados os valores de k_m 7.73 mM e v_{max} 1.71 mM/min/mL. Em geral em enzimas imobilizadas ocorre a diminuição da atividade catalítica devido a alterações conformacionais na estrutura terciária da proteína assim como impedimentos estéreos que impedem o acesso do substrato ao seu sítio ativo e criam barreiras difusionais, o que não ocorre com a enzima livre em solução. Desse modo, em geral, os valores de k_m para enzimas imobilizadas é maior do que em enzimas livres correspondentes (ESPÍN et al., 2000; CHANG; COLLEGE, 2005; SELINHEIMO et al., 2007).

5.7 Curva padrão de inibição com benzoato de sódio: efeito da concentração de substrato

A concentração do substrato é um dos principais fatores que afetam o desempenho de um biossensor baseado em inibição enzimática do tipo competitiva, como é o caso da inibição do benzoato de sódio exercida na tirosinase. Neste tipo de inibição o inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima (UPADHYAY; VERMA, 2012). Por essa razão, é importante determinar a concentração de substrato.

Para este trabalho a determinação da concentração de substrato foi realizada utilizando 3 concentrações de L-tirosina em tampão fosfato de sódio 0.1M pH6, na construção de curvas de inibição com soluções padrões de benzoato de sódio (0.01, 0.02, 0.05, 0.07 e 0.09 g/100 mL) (Figura 38).

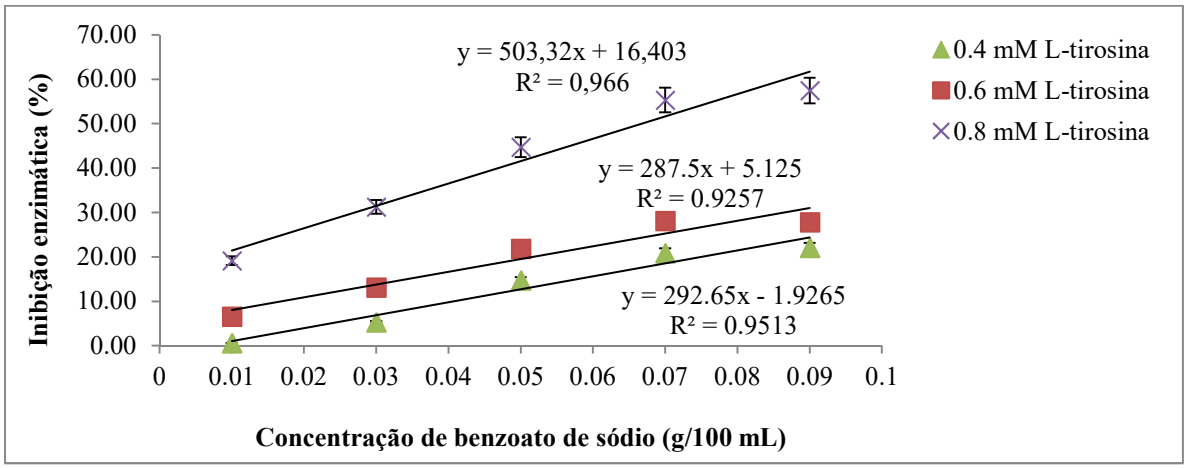


Figura 39 - Influência da concentração do substrato L-tirosina na inibição padrão da enzima tirosinase pelo inibidor benzoato de sódio.

A concentração de substrato afetou a percentagem de inibição das curvas construídas como é possível verificar na Figura 38. A inibição aumentou com o aumento da concentração de substrato. Comportamento semelhante foi encontrado por AMINE et al., (2015).

A concentração de 0.8 mM de L-tirosina foi escolhida para a aplicação do biossensor em amostras comerciais, devido ao maior coeficiente de correlação linear entre a concentração de benzoato de sódio e o percentual de inibição, mostrando que há uma relação direta de proporcionalidade entre o aumento da concentração do inibidor e o percentual de inibição da enzima tirosinase.

5.8 Resultados da aplicação do biossensor em amostras comerciais

Com o objetivo de verificar a possibilidade de aplicação do biossensor, construído e otimizado no presente trabalho, para detecção de ácido benzóico em amostras comerciais de refrescos a base de guaraná, os resultados obtidos para as mesmas amostras usando o biossensor foram comparados aos obtidos pelo método analítico padrão CLAE. Na tabela 8 estão sumarizados os resultados das análises de benzoato de sódio em amostras de refrescos a base de guaraná por CLAE e com o biossensor enzimático proposto neste trabalho.

Tabela 8 - Quantificação de benzoato de sódio em amostras comerciais de refrescos a base de guaraná usando o biossensor e método analítico CLAE.

Amostra	CLAE (g/100 mL)	Biossensor (g/100 mL)	Erro relativo (%)
A_4	0.039 ± 0.004	0.061 ± 0.008	56.41
C_3	0.045 ± 0.008	0.054 ± 0.002	20
B_2	0.044 ± 0.003	0.073 ± 0.003	65.91
B_3	0.037 ± 0.003	0.050 ± 0.009	35.14
C_1 diet	0.028 ± 0.004	0.065 ± 0.008	132.14
B_1 diet	0.046 ± 0.002	0.066 ± 0.004	43.48
C_4 diet	0.032 ± 0.006	0.058 ± 0.001	81.25
C_1	0.039 ± 0.005	0.052 ± 0.003	33.33

* diet: versão baixas calorias
** a numeração sobrescrita indica o lote da amostra

Os resultados apresentados pelo biossensor enzimático foram superiores aos obtidos pelo método CLAE, com percentuais de erro relativo acima de 10%, indicando, possivelmente a presença de interferentes com ação inibidora sobre a enzima tirosinase além do benzoato de sódio.

Diversos inibidores podem interferir na atividade da enzima tirosinase. Dentre as amostras de refresco de guaraná analisadas pelo biossensor proposto, a maioria apresenta ácido ascórbico como antioxidante em sua composição, com exceção das amostras C. Trabalhos da literatura descrevendo biossensores para a detecção de ácido benzóico em amostras de bebidas não alcoólicas que também continham ácido ascórbico relatam a interferência deste na resposta do analito em diferentes percentagens (Quadro 15).

O quadro 15, apresenta a influência de alguns possíveis inibidores que afetam a atividade da enzima tirosinase em biossensores.

Quadro 15 - Influência do ácido ascórbico na inibição da enzima tirosinase em diferentes biossensores.

Inibidor /interferente	**% de inibição**	**Referência**
ácido ascorbico	17	(MORALES et al., 2002)
ácido lático, ácido sórbico, ácido cítrico, cafeína ácido ascorbico	1-4 11	(SHAN et al., 2007)
ácido lático, ácido sórbico, ácido cítrico, sacarina sódica, cafeína ácido ascorbico	1,3-4,7 10,6	(SHAN et al., 2008a)
ácido ascórbico	5,3	(LÓPEZ; LÓPEZ-RUIZ, 2011)

Nas configurações testadas em função da possível presença de interferentes, o biossensor otimizado e construído no presente trabalho, não foi eficiente para detectar ácido benzóico amostras comerciais de refrescos a base de guaraná testadas.

Com base nos resultados deste trabalho foram sumarizadas as conclusões:

- Dentre os métodos de extração da enzima tirosinase a partir do macro fungo *Agaricus bisporus*, testados, a permeabilização com acetona foi o mais eficiente, resultando em extratos com as maiores atividades enzimáticas, com menor volume de extrato, o que confere melhor relação custo benefício para a concentração e purificação parcial por precipitação de proteínas.
- A remoção de resíduos de acetona dos extratos enzimáticos apresentou melhores resultados a 25°C, sem provocar desnaturação da enzima, preservando a atividade enzimática.
- O método de precipitação utilizando sulfato de amônio apresentou melhores resultados de recuperação enzimática da atividade total da tirosinase do que a precipitação com acetona, podendo ser utilizado para a concentração dos extratos enzimáticos e estabilização do biocomponente. A precipitação de maior concentração da enzima tirosinase ocorreu no intervalo de 40%-60%, sendo está o intervalo de precipitação mais adequada quando requerida a purificação parcial da enzima tirosinase.
- A análise do gel de poliacrilamida, revelou a presença de bandas da enzima tirosinase no extrato bruto e no intervalo de saturação de 40-60%, de aproximadamente 12.58 kDa e 50.11 kDa, totalizando aproximadamente 128 kDa. No entanto, podem ser observadas também outras bandas com massas moleculares diversas, indicando a presença de proteínas contaminates, tanto no extrato bruto quanto nos precipitados ressuspendidos.
- A estabilidade de armazenamento de curto e longo prazo mostraram que durante o período de 96 h não houve diferença na estabilidade dos extratos bruto e parcialmente purificados armazenados a temperatura de -6ºC. No entanto, ao longo de 4 meses o extrato bruto perdeu cerca de 25% da atividade enquanto que o extrato parcialmente purificado com sulfato de amônio manteve a atividade catalítica da enzima tirosinase estável.
- De acordo com os resultados dos suportes/métodos de imobilização testados a imobilização covalente-reticulação em membrana de nylon 6,6 foi o método mais eficiente, com 61,6 % de atividade enzimática recuperada.
- A carga enzimática mais adequada aplicada a membrana de nylon 6,6 foi de 3000 U/mL.
- A otimização dos parâmetros de imobilização em suporte de nylon 6,6 por meio de um planejamento fatorial, apresentou como melhores condições: pH 6, concentração de

glutaraldeído para ativação da membrana 1.5% (v/v) em tampão fosfato de sódio 0.1M e concentração de glutaraldeído para a ligação cruzada enzima-enzima 1.5% (v/v).

- A tirosinase imobilizada em membrana de nylon 6,6 reteve cerca de 50% da atividade catalítica depois de 10 ciclos de 6 minutos de reação com o substrato L-tirosina em tampão fosfato de sódio pH a 25 ºC.
- O borohidreto de sódio não foi considerado um redutor adequado para o sistema de imobilização descrito dentro das condições testadas. Além de causar danos ao sítio ativo da tirosina do extrato de *Agaricus bisporus*, ocasionando queda drástica na atividade recuperada da enzima imobilizada, não promoveu aumento da estabilidade operacional.
- A tirosinase imobilizada em membrana de nylon estocada sem tampão fosfato de sódio 0.1M pH 6 a temperatura de 4ºC, com tampão fosfato de sódio 0.1M pH 6 a temperatura 4ºC e sem tampão fosfato de sódio 0.1M pH 6 a temperatura de -6ºC, apresentaram, respectivamente, perda de 39.9% ±2.5, 60,7% ±0,9 e 80.8% ±1,5 nas primeiras 24 horas de estocagem indicando baixa estabilidade de armazenamento nas condições estudadas.
- A enzima tirosinase do extrato de *Agaricus bisporus* livre exibiu maior atividade enzimática na faixa de pH 7 a pH 8. Para a tirosinase imobilizada o pH de maior atividade enzimática foi o pH 6.
- A atividade da enzima tirosinase livre atingiu o maior valor na temperatura de 35 °C, enquanto que a enzima imobilizada apresentou melhor desempenho catalíco na temperatura de 30 °C.
- Os parâmetros cinéticos obtidos pelo método de Lineweaver-Burk resultaram os valores de km equivalente a 0,88 mM e de v_{max} 0,32 mM/min/mL para a enzima livre do extrato de *Agaricus bisporus* e k_m 7.73 mM e v_{max} 1.71 mM/min/mL para a enzima imobilizada.
- A concentração de 0.8 mM de L-tirosina foi escolhida para a aplicação do biossensor em amostras comerciais, devido ao maior coeficiente de correlação linear entre a concentração de benzoato de sódio e o percentual de inibição.

Objetivando a continuidade do desenvolvimento do projeto do biossensor enzimático para detecção de benzoato de sódio baseado na inibição da tirosinase, têm-se as seguintes sugestões:

- Testar o biossensor desenvolvido em outras amostras que contenham benzoato de sódio ou ácido benzoico na sua formulação usado como estabilizante (cosméticos, por exemplo)
- Determinar a influência e possíveis métodos de minimização da interferência na medida usando o biossensor ocasionada por possíveis compostos presentes nas amostras de guaraná (como por exemplo o ácido ascórbico)
- Testar métodos de estabilização para a enzima imobilizada visando aumentar a estabilidade operacional e de estocagem, visando reduzir o custo da construção do biossensor pela sua maior reutilização.
- Testar mais concentrações de substrato na construção da curva padrão de inibição a fim de melhorar o coeficiente de correlação e ampliar a faixa de medida do analito benzoato de sódio/ácido benzóico.

ABIR. **Dados do setor-Refrescos RTD prontos para beber**. [s.l: s.n.].
ABIR, A. B. das I. de R. e de B. N. A. **Consumo de todas as bebidas comerciais 2005-2010**. Disponível em: <http://abir.org.br/2011/10/24/dados-de-mercado-2011/>. Acesso em: 23 fev. 2014.
AEHLE, W. **Enzymes in industry: products and applications**. 2. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2006.
AGARWAL, P.; SAROJO, S. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 12, 17 jul. 2013.
AISSAOUI, N.; LANDOULSI, J.; BERGAOUI, L.; BOUJDAY, S.; LAMBERT, J.-F. Catalytic activity and thermostability of enzymes immobilized on silanized surface: influence of the crosslinking agent. **Enzyme and microbial technology**, v. 52, n. 6-7, p. 336–43, 10 maio 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022913000446>. Acesso em: 2 fev. 2014.
AMERICAN BEVERAGE ASSOCIATION. **Guidance Document to Mitigate the Potential for Benzene Formation in Beverages**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://ameribev.org/files/272_FINAL ABA BENZENE GUIDANCE.pdf>.
AMINE, a.; ARDUINI, F.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G. Recent Advances in Biosensors Based on Enzyme Inhibition. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 1–15, 2015. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095656631530258X>.
AMINE, A.; MOHAMMADI, H.; BOURAIS, I.; PALLESCHI, G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. **Biosensors & bioelectronics**, v. 21, n. 8, p. 1405–23, 15 fev. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16125923>. Acesso em: 9 nov. 2012.
ANIRUDHAN, T. S.; RAUF, T. A. Silane graft copolymer modified with sulphonic acid functional groups used for immobilization of trypsin from aqueous solutions via adsorption process. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, set. 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226086X13004309>. Acesso em: 2 fev. 2014.
ANVISA, A. N. de V. S. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 5, de 15 de janeiro de 2007 - Atribuição de aditivos - Categoría 16.2 - Bebidas não-alcoólicas**. Disponível em: <http://www.a3q.com.br/component/docman/doc_download/7-anvisa-resolucao-rdc-no-5-de-15-de-janeiro-de-2007.html.>. Acesso em: 30 jan. 2014.
APREA, E.; BIASIOLI, F.; CARLIN, S.; MÄRK, T. D.; GASPERI, F. Monitoring benzene formation from benzoate in model systems by proton transfer reaction-mass spectrometry. v. 275, p. 117–121, 2008.
ARDUINI, F.; AMINE, A. Biosensors Based on Enzyme Inhibition. **Biosensors Based on Aptamers and Enzymes**, n. August 2013, p. 299–326, 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/10_2013_224>. Acesso em: 20 mar. 2014.
ARDUINI, F.; AMINE, A.; MOSCONE, D.; RICCI, F.; PALLESCHI, G. Fast, sensitive and cost-effective detection of nerve agents in the gas phase using a portable instrument and an electrochemical biosensor. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 388, n. 5-6, p. 1049–57, jul. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17508205>. Acesso em: 6 fev. 2014.
ASERO, R. Sodium benzoate-induced pruritus. **Allergy**, v. 61, n. 10, p. 1240–1, out. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16942581>. Acesso em: 20 jan. 2014.
ASHURST, P. R. **Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices**. 2 Edition ed. Hereford: Wiley-Blackwell, 2005.

AUGUSTINE, S.; KUDACHIKAR, V. B.; VANAJAKSHI, V.; RAVI, R. Effect of combined preservation techniques on the stability and microbial quality and retention of anthocyanins in grape pomace stored at low temperature. **Journal of food science and technology**, v. 50, n. 2, p. 332–8, abr. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24425924>. Acesso em: 20 jan. 2014.

AV, A.; ADELOYE, D.; MA, A. Food additives and their health implications on children in Africa : a systematic review Les additives alimentaires et leurs conséquences sur la santé des enfants en Afrique : Une revue systématique . **Food additives and children' s health**, v. 3, n. 1, p. 12, 2015.

BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. **Analytical biochemistry**, v. 478, p. 107–20, 1 jun. 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269715001086>. Acesso em: 17 fev. 2016.

BALASUNDARAM, B.; PANDIT, A. B. Significance of location of enzymes on their release during microbial cell disruption. **Biotechnology and bioengineering**, v. 75, n. 5, p. 607–14, 5 dez. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745137>. Acesso em: 10 fev. 2014.

BALATSINOU, L.; DI GIOACCHINO, G.; SABATINO, G.; CAVALLUCCI, E.; CARUSO, R.; GABRIELE, E.; RAMONDO, S.; DI GIAMPAOLO, L.; VERNA, N.; DI GIOACCHINO, M. Asthma worsened by benzoate contained in some antiasthmatic drugs. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 17, n. 2, p. 225–6, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15171824>. Acesso em: 20 jan. 2014.

BANICA, F.-G. **Chemical sensors and biosensors: fundamentals and applications**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2012.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde in Bio-Catalysts Design: A Useful Crosslinker and a Versatile Tool in Enzyme Immobilization. **RSC Adv.**, v. 4, n. 4, p. 1583–1600, 2 dez. 2014. Disponível em: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/ra/c3ra45991h>. Acesso em: 24 maio. 2016.

BARONAS, R.; IVANAUSKAS, F.; KULIS, I. I.; KULYS, J. **Mathematical modeling of biosensors: an introduction for chemists and mathematicians (google ebook)**. [s.l.] Springer, 2009. v. 2009

BARSHICK, S.-A.; SMITH, S. M.; BUCHANAN, M. V; GUERIN, M. R. Determination of Benzene Content in Food Using a Novel Blender Purge and Trap GC/MS Method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 8, n. 3, p. 244–257, set. 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157585710186>.

BARTHELMEBS, L.; BLANCHARD, C. C.; ISTAMBOULIE, G.; MARTY, J. L.; NOGUER, T. Biosensors as Analytical Tools in Food Fermentation Industry - Volume 698 de Advances in Experimental Medicine and Biology. In: GIARDI, M. T.; REA, G.; BERRA, B. (Ed.). **Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors**. [s.l.] Springer, 2010. p. 299–304.

BEEZHOLD, B. L.; JOHNSTON, C. S.; NOCHTA, K. A. Sodium Benzoate-Rich Beverage Consumption is Associated With Increased Reporting of ADHD Symptoms in College Students: A Pilot Investigation. **Journal of Attention Disorders**, p. 1087054712443156–, 25 abr. 2012. Disponível em: <http://jad.sagepub.com/content/early/2012/04/25/1087054712443156.abstract>. Acesso em: 20 jan. 2014.

BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. 4. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009.
BETANCOR, L.; LUCKARIFT, H. R. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 566–72, out. 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779908001972>. Acesso em: 20 jan. 2014.
BHATIA, S. C. **Textbook of biotechnology**. [s.l.] Atlantic Publishers & Dist, 2005.
BILAU, M.; MATTHYS, C.; VINKX, C.; DE HENAUW, S. Intake assessment for benzoates in different subgroups of the Flemish population. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 2, p. 717–23, fev. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17977637>. Acesso em: 17 dez. 2012.
BILITEWSKI, U.; TURNER, A. **Biosensors in environmental monitoring**. 1. ed. [s.l.] CRC Press, 2000.
BISSWANGER, H. **Enzyme kinetics: principles and methods (google ebook)**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008.
BISSWANGER, H. **Practical enzymology**. 2. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.
BISWAS, A. K.; KONDAIAH, N.; ANJANEYULU, A. S. R.; MANDAL, P. K. Food Safety Concerns of Pesticides, Veterinary Drug Residues and Mycotoxins in Meat and Meat Products. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 4, n. 2, p. 46–55, 1 fev. 2010. Disponível em: <http://scialert.net/fulltext/?doi=ajas.2010.46.55&org=12>. Acesso em: 27 fev. 2016.
BONACCORSI, G.; PERICO, A.; COLZI, A.; BAVAZZANO, P.; DI GIUSTO, M.; LAMBERTI, I.; MARTINO, G.; PUGGELLI, F.; LORINI, C. [Benzene in soft drinks: a study in Florence (Italy)]. **Igiene e sanità pubblica**, v. 68, n. 4, p. 523–32, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23073373>. Acesso em: 17 jan. 2014.
BONAKDAR, M.; VILCHEZ, J. L.; MOTTOLA, H. A. Bioamperometric sensors for phenol based on carbon paste electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 266, n. 1, p. 47–55, jul. 1989. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022072889802141>. Acesso em: 30 jan. 2014.
BOSHOFF, A.; BURTON, M. H.; BURTON, S. G. Optimization of catechol production by membrane-immobilized polyphenol oxidase: A modeling approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, p. 1–7, 2003.
BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>. Acesso em: 11 nov. 2013.
BRAHMACHARI, S.; PAHAN, K. Sodium benzoate, a food additive and a metabolite of cinnamon, modifies T cells at multiple steps and inhibits adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 1, p. 275–83, 1 jul. 2007. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1976122&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 29 maio. 2016.
BREWER, S. **Overcoming asthma: the complete complementary health program**. [s.l.] Watkins Media Limited, 2014.
BRIDGE, P. D.; KOKUBUN, T.; SIMMONDS, M. S. J. Protein Extraction From Fungi. In: CUTLER, P. (Ed.). **Protein Purification Protocols**. 1. ed. [s.l.] Humana Press, 2004. p. 484.

BRISOLARI, A.; GONÇALVES, D. Immobilization of Tyrosinase from Avocado Crude Extract in Polypyrrole Films for Inhibitive Detection of Benzoic Acid. **Chemosensors**, v. 2, n. 3, p. 182–192, 3 jul. 2014a. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2227-9040/2/3/182/>. Acesso em: 13 jun. 2016.

BRISOLARI, A.; GONÇALVES, D. Immobilization of Tyrosinase from Avocado Crude Extract in Polypyrrole Films for Inhibitive Detection of Benzoic Acid. **Chemosensors**, v. 2, n. 3, p. 182–192, 3 jul. 2014b. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2227-9040/2/3/182/htm>. Acesso em: 22 abr. 2016.

BRUNO, L. M.; PINTO, G. A. S.; DE CASTRO, H. F.; DE LIMA-FILHO, J. L.; DE MAGALHÃES MELO, E. H. Variables that Affect Immobilization of Mucor Miehei Lipase on Nylon Membrane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 371–375, jun. 2004. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1023/B:WIBI.0000033059.76286.2e>. Acesso em: 12 maio. 2016.

CAMPOS, C. F.; SOUZA, P. E. A.; COELHO, J. V.; GLÓRIA, M. B. . Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of green coconut water. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, n. 6, p. 487–500, dez. 1996. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1745-4549.1996.tb00761.x>. Acesso em: 3 dez. 2013.

CANADIAN BEVERAGE ASSOCIATION. **Guindance Document to Mitigate the Potential for Benzene Formation in Beverages**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.refreshments.ca/system/files/28/original/Benzene_Guidance_CBA_20060622_ENGLISH_FINAL_website_reload_201104.pdf>.

CANOVAS, G. V. B. **Conservación no térmica de alimentos**. [s.l.] Acribia, Editorial, S.A., 1999.

CAO, L. **Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design**. 1. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2006.

CCNRF, C. C. N. de N. de R. y F. S. **NORMA Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba.ordenjuridico.gob.mx**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo73489.doc>. Acesso em: 31 jan. 2014.

CHANG, R.; COLLEGE, W. Enzyme Kinetics. In: **Physical Chemistry for the Biosciences**. 1. ed. [s.l.] University Science Books, 2005. p. 678.

CHANG, T.-S. An updated review of tyrosinase inhibitors. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 6, p. 2440–75, jun. 2009. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2705500&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 23 mar. 2014.

CHEN, H.; ZHANG, Q.; DANG, Y.; SHU, G. The effect of glutaraldehyde cross-linking on the enzyme activity of immobilized ??-galactosidase on chitosan bead. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 5, n. 7, p. 932–935, 2013.

CHOI, M. M. F. Progress in Enzyme-Based Biosensors Using Optical Transducers. **Microchimica Acta**, v. 148, n. 3-4, p. 107–132, 21 out. 2004. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00604-004-0273-8>. Acesso em: 27 jan. 2014.

CHRAMBACH, A. **The practice of quantitative gel electrophoresis**. 1. ed. [s.l.] VCH Weinheim, 1985. v. 15

CHUANG, G. Immobilization of Tyrosinase on Chitosan - An Optimal Approach to Enhance the Productivity of L -DOPA from L -Tyrosine. p. 353–362, 2005.

CLAUDIA RUIZ-CAPILLAS, L. M. L. N. **Flow injection analysis of food additives**. [s.l.] Taylor & Francis, 2016.
COCK, L. S.; ARENAS, A. M. Z.; APONTE, A. A. Use of Enzymatic Biosensors as Quality Indices: A Synopsis of Present and Future Trends in The Food Industry. **Chilean journal of agricultural research**, v. 69, n. 2, p. 1–12, jun. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-58392009000200017&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 2 dez. 2013.
COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. 1 Edição ed. Rio de Janeiro: Editora EPUB, 2008.
COSNIER, S.; MOUSTY, C.; GONDRAN, C.; LEPELLEC, A. Entrapment of enzyme within organic and inorganic materials for biosensor applications: Comparative study. **Materials Science and Engineering: C**, v. 26, n. 2-3, p. 442–447, mar. 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493105003930>. Acesso em: 10 fev. 2014.
CUYPER, M. de; BULTE, J. W. M. **Physics and chemistry basis of biotechnology**. [s.l.] Springer, 2001.
DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, p. 1–9, 2012.
DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. **Antimicrobials in food**. [s.l.] CRC Press, 2010.
DECKER, H.; SCHWEIKARDT, T.; TUCZEK, F. The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered? **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 45, n. 28, p. 4546–50, 10 jul. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16795103>. Acesso em: 2 jan. 2013.
DEL OLMO, A.; CALZADA, J.; NUÑEZ, M. Benzoic Acid and Its Derivatives as Naturally Occurring Compounds in Foods and as Additives: Uses, Exposure and Controversy. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 00–00, 20 nov. 2015. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2015.1087964>. Acesso em: 13 jun. 2016.
DENNISON, C. **A guide to protein isolation**. [s.l.] Springer, 2003.
DIMITRIOS P. NIKOLELIS, G.-P. N. **Biosensors for security and bioterrorism applications**. [s.l.] Springer, 2016.
DINÇER, A.; BECERIK, S.; AYDEMIR, T. Immobilization of tyrosinase on chitosan-clay composite beads. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 815–20, 1 abr. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155214>. Acesso em: 30 jan. 2014.
DINÇKAYA, E.; SEZGINTÜRK, M. K.; AKYILMAZ, E.; ERTAŞ, F. N. Sulfite determination using sulfite oxidase biosensor based glassy carbon electrode coated with thin mercury film. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1540–1544, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606003220>. Acesso em: 19 jan. 2014.
DONG, M.; WU, Z.; LU, M.; WANG, Z.; LI, Z. Combining the physical adsorption approach and the covalent attachment method to prepare a bifunctional bioreactor. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 9, p. 11443–54, jan. 2012. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3472756&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 6 fev. 2014.
DUNN, M. J.; BRADD, S. J. Separation and analysis of membrane proteins by SDS-

polyacrylamide gel electrophoresis. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 19, p. 203–10, jan. 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8220699>. Acesso em: 26 mar. 2014.
EFSA, E. F. S. A. Assessment of the results of the study by McCann et al . (2007) on the effect of some colours and sodium benzoate on children's behaviour. **EFSA**, v. 1, n. 660, p. 1–54, 2008. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/660.pdf>.
EGGINS, B. R. **Chemical sensors and biosensors**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008.
ENE, C. P.; DIACU, E. High Performance Liquid chromatography method for the determination of benzoic acid in beverages. **U.P.B. Science Bulletin**, v. 71, n. 4, p. 81–88, 2009. Disponível em: <http://www.scientificbulletin.upb.ro/rev_docs_arhiva/full2156.pdf>. Acesso em: 4 fev. 2014.
EPC, E. P. and C. **European Parliament and Council Directive No 95/2/EC of 20 February 1995 on food additives other than colours and sweeteners**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav11_en.pdf>.
ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C.; LOPEZ, M. Á. **Agricultural and food electroanalysis**. [s.l: s.n.]
ESPÍN, J. C.; VARÓN, R.; FENOLL, L. G.; GILABERT, M. A.; GARCÍA-RUÍZ, P. A.; TUDELA, J.; GARCÍA-CÁNOVAS, F. Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 5, p. 1270–1279, 21 mar. 2000. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1327.2000.01013.x>. Acesso em: 28 mar. 2014.
ESPÍN, J. C.; WICHERS, H. J. Activation of a Latent Mushroom (Agaricus bisporus) Tyrosinase Isoform by Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Kinetic Properties of the SDS-Activated Isoform. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3518–3525, set. 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf981275p>. Acesso em: 28 mar. 2014.
FAN, Y.; FLURKEY, W. H. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of Portabella mushrooms. **Phytochemistry**, v. 65, n. 6, p. 671–8, mar. 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942204000044>. Acesso em: 27 mar. 2014.
FANG, Y.; RAMASAMY, R. P. Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection. **Biosensors**, v. 5, n. 3, p. 537–61, jan. 2015. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4600171&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 7 fev. 2016.
FARIA, R. O. de; MOURE, V. R.; AMAZONAS, M. A. L.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. The Biotechnological Potential of Mushroom Tyrosinases. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 287–294, 2007.
FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. da C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 455–464, maio 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000300019&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 23 fev. 2014.
FDA, F. and D. A. **Food Additives & Ingredients - Food Additive Status List**. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm091048.htm#ftnB>. Acesso em: 30 jan. 2014.
FENOLL, L. G.; PEÑALVER, M. J.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; VARÓN, R.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; TUDELA, J. Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 2, p. 235–46, fev. 2004. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643889>. Acesso em: 20 jan. 2014.
FENOLL, L. G.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; VARÓN, R.; GARCÍA-RUIZ, P. A.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; TUDELA, J. Kinetic study of the oxidation of 3-hydroxyanisole catalysed by tyrosinase. **Biophysical Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 65–76, fev. 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301462299001490>. Acesso em: 28 mar. 2014.
FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6-7, p. 405–418, dez. 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022909001859>. Acesso em: 1 fev. 2014.
FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; MENDES, E.; BRITO, P.; FERREIRA, M. A. Simultaneous determination of benzoic and sorbic acids in quince jam by HPLC. **Food Research International**, v. 33, n. 2, p. 113–117, mar. 2000. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996900000144>. Acesso em: 5 fev. 2014.
FREE, S. J. Fungal cell wall organization and biosynthesis. In: **Advances in genetics**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. 81p. 33–82.
FU, J.; REINHOLD, J.; WOODBURY, N. W. Peptide-modified surfaces for enzyme immobilization. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e18692, jan. 2011. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0018692>. Acesso em: 24 jan. 2014.
FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis : uma revisão. v. 64, n. 2, p. 149–154, 2005.
FURTADO, R. F.; DUTRA, R. A. F. **Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos.Embrapa …**, 2008. . Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2012/BR/BR2012112900129.xml;BR20081427390>. Acesso em: 13 mar. 2013.
GARDNER, L. K.; LAWRENCE, G. D. Benzene production from decarboxylation of benzoic acid in the presence of ascorbic acid and a transition-metal catalyst. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 5, p. 693–695, maio 1993. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00029a001>. Acesso em: 22 jan. 2013.
GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. V. **Tecnologia de alimentos**. 1 Edition ed. São Paulo: NBL Editora, 2009.
GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 6, p. 541–553, jan. 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694602000389>. Acesso em: 10 fev. 2014.
GIARDI, M. T.; REA, G.; BERRA, B. **Bio-farms for nutraceuticals: functional food and safety control by biosensors (google ebook)**. [s.l.] Springer, 2011.
GIL, E. S.; MULLER, L.; SANTIAGO, M. F.; GARCIA, T. A. Biossensor a Base de Extrato Bruto de Lacase (Pycnoporus sanguineus) para Análise Ambiental de Compostos Fenólicos. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 27, n. 3, p. 215–225, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.gpeari.mctes.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0872-19042009000300004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 23 fev. 2014.
GIMENEZ-ARNAU, A. M.; MAIBACH, H. I. **Contact urticaria syndrome**. [s.l.] CRC Press, 2014. v. 5
GOLDBERG, E. **Handbook of downstream processing**. [s.l.] Taylor & Francis, 1997.
GOLDBERG, S. Mechanical/physical methods of cell disruption and tissue homogenization. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 424, n. 1, p. 3–22, jan. 2008. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18369848>.
GOMES, E.; ANDRÉS, M.; GUEZ, U.; MARTIN, N. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. v. 30, n. 1, p. 136–145, 2007.
GÖPEL, W.; JONES, T. A.; KLEITZ, M.; LUNDSTRÖM, I.; SEIYAMA, T. **Sensors, chemical and biochemical sensors**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008. v. 2008
GÓRECKA, E.; JASTRZĘBSKA, M. Immobilization techniques and biopolymer carriers. **Biotechnology and Food Science**, v. 75, n. 1, p. 65–85, 2011. Disponível em: <http://www.bfs.p.lodz.pl/get_file.php?fileId=10>. Acesso em: 8 fev. 2014.
GOULD, G. W. Preservation: past, present and future. **British medical bulletin**, v. 56, n. 1, p. 84–96, jan. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10885107>. Acesso em: 20 jan. 2014.
GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors-Sensor principles and architectures. **Sensors**, n. January, p. 1400–1458, 2008. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1424-8220/8/3/1400>. Acesso em: 30 nov. 2013.
GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. 2. ed. [s.l.] Springer, 2006.
GULLINO, M. L.; BONANTS, P. J. M. **Detection and diagnostics of plant pathogens**. [s.l.] Springer, 2014.
HAGHBEEN, K.; WUE TAN, E. Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates. **Analytical biochemistry**, v. 312, n. 1, p. 23–32, 1 jan. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12479831>.
HALAOULI, S.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J.-C.; HAMDI, M.; LOMASCOLO, a. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. **Journal of applied microbiology**, v. 100, n. 2, p. 219–32, fev. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16430498>. Acesso em: 20 fev. 2013.
HAMZAH, H. H.; YUSOF, N. A.; SALLEH, A. B.; BAKAR, F. A. An Optical Test Strip for the Detection of Benzoic Acid in Food. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 8, p. 7302–13, 25 jan. 2011. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1424-8220/11/8/7302>. Acesso em: 5 fev. 2014.
HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society reviews**, v. 38, n. 2, p. 453–68, fev. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19169460>. Acesso em: 20 jan. 2014.
HARRIS, J. M. **Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications (google ebook)**. [s.l.] Springer, 1992.
HASHIMOTO, K. **Handbook of behavior, food and nutrition**. New York, NY: Springer New York, 2011.
HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. **Isolation and purification of proteins**. [s.l.] CRC Press, 2003.
HO, C. W.; TAN, W. S.; YAP, W. B.; LING, T. C.; TEY, B. T. Comparative evaluation of different cell disruption methods for the release of recombinant hepatitis B core antigen from Escherichia coli. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13, n. 5, p. 577–583, 20 nov. 2008. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12257-008-0020-9>. Acesso em: 5 jan. 2014.
[CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.]
HUET, A.-C.; DELAHAUT, P.; FODEY, T.; HAUGHEY, S. a.; ELLIOTT, C.; WEIGEL, S. Advances in biosensor-based analysis for antimicrobial residues in foods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1281–1294, dez. 2010. Disponível em:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993610002438>. Acesso em: 19 jan. 2014.
HUGHES, G.; PEMBERTON, R.; FIELDEN, P.; HART, J. P.; HUGHES, G.; PEMBERTON, R.; FIELDEN, P.; HART, J. P. Development of a disposable screen-printed amperometric biosensor based on glutamate dehydrogenase, for the determination of glutamate in clinical and food applications. 2014.
IARC. **Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42**PMID:3482203International Agency for Research on Cancer, , 1987. . Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-24.pdf>.
IKRAM-UL-HAQ; ALI, S.; QADEER, M. A. Biosynthesis of l-DOPA by Aspergillus oryzae. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 1, p. 25–29, out. 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852402000603>. Acesso em: 30 jan. 2014.
ILLANES, A. **Enzyme biocatalysis: principles and applications**. [s.l.] Springer, 2008.
ISGROVE, F. H.; WILLIAMS, R. J. H.; NIVEN, G. W.; ANDREWS, a. T. Enzyme immobilization on nylon-optimization and the steps used to prevent enzyme leakage from the support. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 225–232, 2001.
IUPAC. **IUPAC. Compendium of Chemical Terminology**. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/B00663.html>. Acesso em: 30 nov. 2013.
JACOB, S. E.; HILL, H.; LUCERO, H.; NEDOROST, S. Benzoate Allergy in Children-From Foods to Personal Hygiene Products. **Pediatric dermatology**, 3 fev. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26840540>. Acesso em: 1 mar. 2016.
JETRO, J. E. T. O. **Specifications and Standards for Foods, Food Additives, etc. Under the Food Sanitation Act (Abstract) 2010**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.jetro.go.jp/en/reports/regulations/pdf/foodext2010e.pdf>.
JIMENÉZ, C.; LEÓN, D. E. P. Biosensors: implementation and outlook in the control and process quality and foodstuffs. **Vitae**, v. 16, n. 1, p. 144–154, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042009000100017&lng=en&nrm=iso&tlng=es>. Acesso em: 31 jan. 2014.
KAMEDA, E.; LANGONE, M. A. P.; COELHO, M. A. Z. Tyrosinase extract from Agaricus bisporus mushroom and its in natura tissue for specific phenol removal. **Environmental technology**, v. 27, n. 11, p. 1209–15, nov. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17203602>. Acesso em: 3 dez. 2013.
KARBASSI, F.; HAGHBEEN, K.; SABOURY, a. .; RANJBAR, B.; MOOSAVI-MOVAHEDI, a. . Activity, structural and stability changes of mushroom tyrosinase by sodium dodecyl sulfate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 32, n. 2, p. 137–143, out. 2003. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777650300153X>. Acesso em: 19 jan. 2014.
KERRY, J.; BUTLER, P. **Smart packaging technologies for fast moving consumer goods**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008.
KIRSCH, J.; SILTANEN, C.; ZHOU, Q.; REVZIN, A.; SIMONIAN, A. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 22, p. 8733–68, 21 out. 2013a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23852443>. Acesso em: 12 nov. 2013.
KIRSCH, J.; SILTANEN, C.; ZHOU, Q.; REVZIN, A.; SIMONIAN, A. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 22, p. 8733–68, 21 nov. 2013b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23852443>. Acesso em: 13 jan. 2014.
KLIMEK-OCHAB, M.; BRZEZIŃSKA-RODAK, M.; ZYMAŃCZYK-DUDA, E.; LEJCZAK,

B.; KAFARSKI, P. Comparative study of fungal cell disruption--scope and limitations of the methods. **Folia microbiologica**, v. 56, n. 5, p. 469–75, set. 2011. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3189342&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 11 dez. 2013.
KOCHANA, J.; KOZAK, J.; SKROBISZ, A.; WOŹNIAKIEWICZ, M. Tyrosinase biosensor for benzoic acid inhibition-based determination with the use of a flow-batch monosegmented sequential injection system. **Talanta**, v. 96, p. 147–52, 15 jul. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22817942>. Acesso em: 17 dez. 2012.
KOKYA, T. A.; FARHADI, K.; KALHORI, A. A. Optimized Dispersive Liquid–Liquid Microextraction and Determination of Sorbic Acid and Benzoic Acid in Beverage Samples by Gas Chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 3, p. 351–358, 18 maio 2011. Disponível em: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s12161-011-9245-x>. Acesso em: 22 jan. 2013.
KOUGIANOS, E. Biosensors : A tutorial review. n. April, p. 35–40, 2006.
KREBS, H. A.; WIGGINS, D.; STUBBS, M.; SOLS, A.; BEDOYA, F. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. **The Biochemical journal**, v. 214, n. 3, p. 657–63, 15 set. 1983. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1152300&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 20 jan. 2014.
KÜES, U.; LIU, Y. Fruiting body production in basidiomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 141–152, 15 ago. 2000. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s002530000396>. Acesso em: 20 jan. 2014.
KUSWANDI, B.; WICAKSONO, Y.; JAYUS; ABDULLAH, A.; HENG, L. Y.; AHMAD, M. Smart packaging: Sensors for monitoring of food quality and safety. **Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety**, v. 5, n. 3-4, p. 137–146, 2011.
LACHENMEIER, D. W.; STEINBRENNER, N.; LÖBELL-BEHRENDS, S.; REUSCH, H.; KUBALLA, T. Benzene Contamination in Heat-Treated Carrot Products Including Baby Foods. p. 39–42, 2010.
LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970. Disponível em: <http://www.nature.com/nature/journal/v227/n5259/pdf/227680a0.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2013.
LANGEL, D. **Biosynthesis of the unique necic acid moiety in lycopsamine type pyrrolizidine alkaloids: a molecular approach**. [s.l.] Cuvillier Verlag, 2008.
LAROU, E.; YIAKOUMETTIS, I.; KALTSAS, G.; PETROPOULOS, A.; SKANDAMIS, P.; KINTZIOS, S. High throughput cellular biosensor for the ultra-sensitive, ultra-rapid detection of aflatoxin M1. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 208–212, jan. 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512003416>. Acesso em: 31 jan. 2014.
LAW, J. W.-F.; AB MUTALIB, N.-S.; CHAN, K.-G.; LEE, L.-H. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 770, jan. 2014. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4290631&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 19 nov. 2015.
LEE, B. H. **Fundamentals of food biotechnology**. [s.l.] Wiley, 2014.
LI, L.; BALLADA, A. **Engineering of polymers and chemical complexity, volume i: current state of the art and perspectives**. [s.l.] CRC Press, 2016.

LI, S.; TAN, Y.; WANG, P.; KAN, J. Inhibition of benzoic acid on the polyaniline–polyphenol oxidase biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 144, n. 1, p. 18–22, 29 jan. 2010. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400509006765>. Acesso em: 19 jan. 2014.
LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 3, p. 658–666, mar. 1934. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/ja01318a036>. Acesso em: 22 fev. 2014.
LINO, C. M.; PENA, A. Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p. 503–508, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610000178>. Acesso em: 20 jan. 2014.
LÓPEZ, M. S.-P.; LÓPEZ-RUIZ, B. Inhibition Biosensor Based on Calcium Phosphate Materials for Detection of Benzoic Acid in Aqueous and Organic Media. **Electroanalysis**, v. 23, n. 1, p. 264–271, 15 jan. 2011. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/elan.201000488>. Acesso em: 22 jan. 2013.
LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal of biotechnology**, v. 119, n. 1, p. 70–5, 22 set. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16039744>. Acesso em: 4 fev. 2014.
MACHADO, R. M. D.; TFOUNI, S. A. V.; VITORINO, S. H. P.; VICENTE, E.; TOLEDO, M. C. de F. Presença dos ácidos benzóico e sórbico em vinhos e sidras produzidos no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 847–850, 2007.
MALHOTRA, B. D.; TURNER, A. **Advances in biosensors: perspectives in biosensors**. 1 Edição ed. [s.l.] Elsevier, 2003.
MAPA. **Resolução RDC nº 5, de 15 de janeiro de 2007**. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/arquivosislegis/anexos/rb/anexo_res5ms_2007.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2014.
MAPA, M. da A. P. e A. **DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009**. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 23 fev. 2014.
MARQUES, P. R. B. de O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791–1799, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n7/v31n7a34.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2014.
MARTINS, A. P. B.; LEVY, R. B.; CLARO, R. M.; MOUBARAC, J. C.; MONTEIRO, C. A. Increased contribution of ultra-processed food products in the Brazilian diet (1987-2009). **Revista de saúde pública**, v. 47, n. 4, p. 656–65, ago. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102013000400656&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 23 fev. 2014.
MCNEAL, T. P.; NYMAN, P. J.; DIACHENKO, G. W.; HOLLIFIELD, H. C. Survey of benzene in foods by using headspace concentration techniques and capillary gas chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 76, n. 6, p. 1213–9, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8286958>. Acesso em: 17 dez. 2012.
MELLO, L. D.; FERREIRA, D. C. M.; KUBOTA, L. T. Enzymes as Analytical Tool in Food Processing. In: PANESAR, P. S.; CHOPRA, H. K.; MARWAHA, S. S. (Ed.). **Enzymes in Food Processing: Fundamentals and Potential Applications**. [s.l.] I. K. International Pvt Ltd, 2010.

p. 365.
MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 237–256, maio 2002. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814602001048>.
MELO, A. F.; MAURICIO, E. F.; SALGADO, A. M.; PELLEGRINI PESSOA, F. L.; TRICHES DAMASO, M. C.; COURI, S. Assessment of catalytic properties in aqueous and media of aspergillus niger lipase immobilized on supports vitreous. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 973–978, 2011.
METCALFE, D. D.; SAMPSON, H. A.; SIMON, R. A. **Food allergy: adverse reactions to foods and food additives**. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2008.
METCALFE, D. D.; SAMPSON, H. A.; SIMON, R. A.; LACK, G. **Food allergy: adverse reaction to foods and food additives**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.
MIELENZ, J. R.; ADNEY, W. S.; MCMILLAN, J. D. **Biotechnology for fuels and chemicals: the twenty-eighth symposium.** [s.l.] Springer Science & Business Media, 2009.
MISHRA, M. **Handbook of encapsulation and controlled release**. [s.l.] CRC Press, 2015.
MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 4 mar. 2015. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13102818.2015.1008192>. Acesso em: 13 jun. 2016.
MONOŠÍK, R.; STREĎANSKÝ, M.; ŠTURDÍK, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, n. 1, p. 109–120, 1 jan. 2012. Disponível em: <http://www.degruyter.com/view/j/acs.2012.5.issue-1/v10188-012-0017-z/v10188-012-0017-z.xml>. Acesso em: 31 jan. 2014.
MONOSIK, R.; STREDANSKY, M.; TKAC, J.; STURDIK, E. Application of Enzyme Biosensors in Analysis of Food and Beverages. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 1, p. 40–53, 2012.
MORALES, M. D.; MORANTE, S.; ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C.; REVIEJO, A. J.; PINGARRÓN, J. M. Design of a composite amperometric enzyme electrode for the control of the benzoic acid content in food. **Talanta**, v. 57, n. 6, p. 1189–98, 19 jul. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18968725>.
MORI, F.; BARNI, S.; PUCCI, N.; ROSSI, M. E.; DE MARTINO, M.; NOVEMBRE, E. Cutaneous adverse reactions to amoxicillin-clavulanic acid suspension in children: the role of sodium benzoate. **Current drug safety**, v. 7, n. 2, p. 87–91, 2012.
MORSI, R. M. Y.; EL-TOBGY, K. Probability of Benzene Forming in Egyptian Non-Alcohol Carbonated Soft Drinks. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 3, p. 271–278, 2012.
MOSCONE, D.; VOLPE, G.; ARDUINI, F.; MICHELI, L. Rapid electrochemical screening methods for food safety and quality. **ACTA IMEKO**, v. 5, n. 1, p. 45–50, 2016.
MOTA, F. J. .; FERREIRA, I. M. P. L. V. .; CUNHA, S. C.; BEATRIZ, M.; OLIVEIRA, P. . Optimisation of extraction procedures for analysis of benzoic and sorbic acids in foodstuffs. **Food Chemistry**, v. 82, n. 3, p. 469–473, ago. 2003. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460300116X>. Acesso em: 5 fev. 2014.
MOTARJEMI, Y.; LELIEVELD, H. **Food safety management: a practical guide for the food industry**. [s.l.] Academic Press, 2013.
MOTARJEMI, Y.; MOY, G.; TODD, E. **Encyclopedia of food safety**. [s.l.] Academic Press,

2013.
MOUBARAC, J.-C.; BATAL, M.; MARTINS, A. P. B.; CLARO, R.; LEVY, R. B.; CANNON, G.; MONTEIRO, C. Processed and Ultra-processed Food Products: Consumption Trends in Canada from 1938 to 2011. **Canadian Journal of Dietetic Practice and Research**, v. 75, n. 1, p. 15–21, 1 abr. 2014. Disponível em: <http://dcjournal.metapress.com/content/u227u70603q05763/>. Acesso em: 23 fev. 2014.
MOUTINHO, I. L. D.; BERTGES, L. C.; ASSIS, R. V. C. Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow no 5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 1, p. 141–5, fev. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17505761>. Acesso em: 20 jan. 2014.
MOWAD, C. M.; ANDERSON, B.; SCHEINMAN, P.; POOTONGKAM, S.; NEDOROST, S.; BROD, B. Allergic contact dermatitis: Patient management and education. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 6, p. 1043–54, jun. 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962215014425>. Acesso em: 29 maio. 2016.
MPF, M. P. F. **Fabricantes comprometem-se a reduzir níveis de benzeno em refrigerantes — Procuradoria da República em Minas Gerais**. Disponível em: <http://www.prmg.mpf.gov.br/imprensa/noticias/consumidor-e-ordem-economica/fabricantes-comprometem-se-a-reduzir-niveis-de-benzeno-em-refrigerantes>. Acesso em: 5 fev. 2013.
MPOUNTOUKAS, P.; VANTARAKIS, A.; SIVRIDIS, E.; LIALIARIS, T. Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 7, p. 2390–3, jul. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18467014>. Acesso em: 29 maio. 2016.
MUNJAL, N.; SAWHNEY, S. . Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 5, p. 613–619, maio 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022902000194>. Acesso em: 30 maio. 2016.
MUTLU, M. **Biosensors in food processing, safety, and quality control**. CRC Press ed. [s.l.] CRC Press, 2010.
NAIR, B. Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. **International journal of toxicology**, v. 20 Suppl 3, p. 23–50, jan. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11766131>. Acesso em: 20 jan. 2014.
NYMAN, P. J.; DIACHENKO, G. W.; PERFETTI, G. a; MCNEAL, T. P.; HIATT, M. H.; MOREHOUSE, K. M. Survey results of benzene in soft drinks and other beverages by headspace gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 2, p. 571–6, 23 jan. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18072742>.
NYMAN, P. J.; WAMER, W. G.; BEGLEY, T. H.; DIACHENKO, G. W.; PERFETTI, G. a. Evaluation of accelerated UV and thermal testing for benzene formation in beverages containing benzoate and ascorbic acid. **Journal of food science**, v. 75, n. 3, p. C263–7, abr. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20492277>. Acesso em: 11 nov. 2012.
OLIVEIRA, I.; VIEIRA, I. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 932–939, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/%0D/qn/v29n5/31052.pdf>. Acesso em: 1 fev. 2014.
ÖNNERFJORD, P. Tyrosinase graphite-epoxy based composite electrodes for detection of

phenols. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 10, n. 6-7, p. 607–619, 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/095656639596937T>. Acesso em: 30 jan. 2014.
ONYEMAOBI, O. I.; WILLIAMS, G. O.; ADEKOYA, K. O. Cytogenetic effects of two food preservatives, sodium metabisulphite and sodium benzoate on the root tips of Allium cepa linn. **Ife Journal of Science**, v. 14, n. 1, p. 155–165, 2012. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/235981077_CYTOGENETIC_EFFECTS_OF_TWO_FOOD_PRESERVATIVES_SODIUM_METABISULPHITE_AND_SODIUM_BENZOATE_ON_THE_ROOT_TIPS_OF_ALLIUM/file/72e7e5152a2b112c89.pdf>. Acesso em: 23 fev. 2014.
OZKAN, S. A.; KAUFFMANN, J.-M.; ZUMAN, P. **Electroanalysis in biomedical and pharmaceutical sciences**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015.
PACOR, M. L.; DI LORENZO, G.; MARTINELLI, N.; MANSUETO, P.; RINI, G. B.; CORROCHER, R. Monosodium benzoate hypersensitivity in subjects with persistent rhinitis. **Allergy**, v. 59, n. 2, p. 192–7, fev. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14763933>. Acesso em: 20 jan. 2014.
PAHAN, K. Immunomodulation of experimental allergic encephalomyelitis by cinnamon metabolite sodium benzoate. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 33, n. 4, p. 586–93, dez. 2011. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3206174&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 29 maio. 2016.
PALCHETTI, I.; MASCINI, M. Biosensor Techniques for Environmental Monitoring. In: **Nucleic Acid Biosensors for Environmental Pollution Monitoring**. [s.l.] Royal Society of Chemistry, 2011. p. 176.
PALMER, T.; BONNER, P. L. **Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical chemistry**. 2. ed. [s.l.] Elsevier, 2007.
PANESAR, P. S.; MARWAHA, S. S.; CHOPRA, H. K. Fundamentals of Enzymes. In: **Enzymes in Food Processing: Fundamentals and Potential Applications**. [s.l.] I K International Publishing House Pvt. Ltd, 2010. p. 386.
PAPA, G.; PESSIONE, E.; LEONE, V.; GIUNTA, C. Agaricus bisporus tyrosinase—I. Progress made in preparative methods. **International Journal of Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 215–221, fev. 1994. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0020711X94901481>. Acesso em: 27 mar. 2014.
PARK, S.; BLANCK, H. M.; SHERRY, B.; JONES, S. E.; PAN, L. Regular-soda intake independent of weight status is associated with asthma among US high school students. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 113, n. 1, p. 106–11, jan. 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212267212016474>. Acesso em: 29 maio. 2016.
PATEL, P. . (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 96–115, fev. 2002. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993601001364>.
PIALIS, P.; JIMENEZ HAMANN, M. C.; SAVILLE, B. A. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on nylon 6,6. **Biotechnology and bioengineering**, v. 51, n. 2, p. 141–7, 20 jul. 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18624322>. Acesso em: 15 mar. 2015.
PIERPOINT, W. S. The Extraction of Enzymes From Plant Tissues Rich in Phenolic Compounds - Protein Purification Protocols. In: CUTLER, P. (Ed.). **Protein Purification Protocols**. New

Jersey: Humana Press, 2003. 244p. 65–74.
POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1653–1666, ago. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2009000800002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 20 jan. 2014.
PONGSAVEE, M. Effect of sodium benzoate preservative on micronucleus induction, chromosome break, and Ala40Thr superoxide dismutase gene mutation in lymphocytes. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
PREEDY, V. R.; PATEL, V. **Biosensors and environmental health**. [s.l.] CRC Press, 2012.
PUNDI, C. S.; CHAUHAN, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. **Analytical Biochemistry**, v. 429, n. 1, p. 19–31, 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269712003387>. Acesso em: 19 jan. 2014.
QI, P.; HONG, H.; LIANG, X.; LIU, D. Assessment of benzoic acid levels in milk in China. **Food Control**, v. 20, n. 4, p. 414–418, abr. 2009. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713508001801>. Acesso em: 17 dez. 2012.
RAMADAS, M.; PAUL, W.; DILEEP, K. J.; ANITHA, Y.; SHARMA, C. P. Lipoinsulin encapsulated alginate-chitosan capsules: intestinal delivery in diabetic rats. **Journal of microencapsulation**, v. 17, n. 4, p. 405–11, jan. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10898081>. Acesso em: 12 maio. 2016.
RICCI, F.; PALLESCHI, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. **Biosensors & bioelectronics**, v. 21, n. 3, p. 389–407, 15 set. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16076428>. Acesso em: 23 jan. 2014.
RICHMAN, S. A.; KRANZ, D. M.; STONE, J. D. Biosensor Detection Systems: Engineering Stable, High-Affinity Bioreceptors by Yeast Surface Display. Methods in Molecular Biology. v. 504, n. 5, p. 1–23, 2009. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-569-9>. Acesso em: 26 nov. 2013.
RICKE, S. C.; DONALDSON, J. R.; PHILLIPS, C. A. **Food safety: emerging issues, technologies and systems**. [s.l.] Elsevier Science, 2015.
RIPP, S.; DICLAUDIO, M. L.; SAYLER, G. S. Biosensors as Environmental Monitors. In: MITCHELL, R.; GU, J.-D. (Ed.). **Environmental Microbiology**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2010. p. 410.
ROLFF, M.; SCHOTTENHEIM, J.; WENDT, F.; TUCZEK, F. **Copper-mediated Activation of Oxygen — Anorganische Chemie**. Disponível em: <http://www.ac.uni-kiel.de/tuczek/research-new/oxygen-activation>. Acesso em: 19 jan. 2014.
RONCERO, C. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. **Current genetics**, v. 41, n. 6, p. 367–78, set. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12228806>. Acesso em: 15 dez. 2013.
ROSENBERG, I. M. **Protein analysis and purification: benchtop techniques**. [s.l.] Springer, 2006.
ROSENBERG, I. M. **Protein analysis and purification: benchtop techniques**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2013.
ROSS, A. I. V; GRIFFITHS, M. W.; MITTAL, G. S.; DEETH, H. C. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. **International journal of food microbiology**, v. 89, n. 2-3, p. 125–38, 31 dez. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623378>. Acesso em: 20 jan. 2014.

RUIZ-HERRERA, J.; GONZÁLEZ-PRIETO, J. M.; RUIZ-MEDRANO, R. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. **FEMS yeast research**, v. 1, n. 4, p. 247–56, jan. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12702327>.
RUMAYOR, V. G.; IGLESIAS, E. G.; GALÁN, O. R.; CABEZAZ, L. G. **Aplicaciones de biosensores en la indústria agroalimentaria**MadridElecé Industria Gráfica, , 2005. . Disponível em: <http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt1_aplicaciones_de_biosensores_en_la_industria_agroalimentaria.pdf>.
RUSMINI, F.; ZHONG, Z.; FEIJEN, J. Protein immobilization strategies for protein biochips. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1775–89, jun. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17444679>.
RUSSELL, N. J.; GOULD, G. W. **Food preservatives**. [s.l.] Springer, 2003.
SADANA, A. **Engineering biosensors: kinetics and design applications (google ebook)**. [s.l.] Academic Press, 2001.
SADEGHI, S.; FOOLADI, E.; MALEKANEH, M. A nanocomposite/crude extract enzyme-based xanthine biosensor. **Analytical Biochemistry**, v. 464, p. 51–59, 2014.
SALTMARSH, M. Recent trends in the use of food additives in the United Kingdom. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 95, n. 4, p. 649–52, 15 mar. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789520>. Acesso em: 29 maio. 2016.
SÁNCHEZ-FERRER, a; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; GARCÍA-CARMONA, F. **Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism.Biochimica et biophysica acta**, 22 fev. 1995. . Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7873577>.
SANTOS, J. C. S. dos; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. 2413–2432, 17 ago. 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/cctc.201500310>. Acesso em: 13 jun. 2016.
SANTOS, V. P. S. dos. **Desenvolvimento de um método de detecção de ácido benzóico em refrescos a base de guaraná**. 2012. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://tpqb.eq.ufrj.br/resumos/deteccao-de-acido-benzoico-em-refrescos-de-guarana/>. Acesso em: 3 dez. 2013.
SANTOS, V. dos; SILVA, L. Application of Agaricus bisporus Extract for Benzoate Sodium Detection Based on Tyrosinase Inhibition for Biosensor Development. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 1831–1836, 2013. Disponível em: <http://www.aidic.it/cet/13/32/306.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2014.
SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21951558>. Acesso em: 7 nov. 2013.
SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice** . [s.l.] Springer, 1994.
SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2013.
SEEDAT, R. Y. The role of food allergy in rhinitis and nasal polyposis. **Current Allergy and Clinical Immunology**, v. 28, n. 2, p. 114–117, 2015. Disponível em: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L605105197>.
SELINHEIMO, E.; NIEIDHIN, D.; STEFFENSEN, C.; NIELSEN, J.; LOMASCOLO, A.; HALAOULI, S.; RECORD, E.; O'BEIRNE, D.; BUCHERT, J.; KRUUS, K. Comparison of the

characteristics of fungal and plant tyrosinases. **Journal of biotechnology**, v. 130, n. 4, p. 471–80, 15 jul. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17602775>. Acesso em: 30 nov. 2013.

SEO, S.-Y.; SHARMA, V. K.; SHARMA, N. Mushroom tyrosinase: recent prospects. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2837–53, 7 maio 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12720364>.

SERGEY YURISH. **Sensors and biosensors, mems technologies and its applications**. [s.l: s.n.]

SERNA-COCK, L.; PERENGUEZ-VERDUGO, J. G. Biosensors Applications in Agri-food Industry. In: SOMERSET, V. (Ed.). **Biosensors Applications in Agri-food Industry**. Fist ed. [s.l.] Intechopen, 2011. p. 1–2.

SEZGINTÜRK, M. K.; GÖKTUG, T.; DINÇKAYA, E. Detection of benzoic acid by an amperometric inhibitor biosensor based on mushroom tissue homogenate. **Food Technology and …**, v. 43, n. 4, p. 329–334, 2005. Disponível em: <http://www.ftb.pbf.hr/import/43-4-3.pdf>. Acesso em: 5 fev. 2014.

SHAN, D.; LI, Q.; XUE, H.; COSNIER, S. A highly reversible and sensitive tyrosinase inhibition-based amperometric biosensor for benzoic acid monitoring. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 134, n. 2, p. 1016–1021, set. 2008a. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400508004899>. Acesso em: 4 jan. 2013.

SHAN, D.; LI, Q.; XUE, H.; COSNIER, S. A highly reversible and sensitive tyrosinase inhibition-based amperometric biosensor for benzoic acid monitoring. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 134, n. 2, p. 1016–1021, set. 2008b. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400508004899>. Acesso em: 19 jan. 2014.

SHAN, D.; SHI, Q.; ZHU, D.; XUE, H. Inhibitive detection of benzoic acid using a novel phenols biosensor based on polyaniline-polyacrylonitrile composite matrix. **Talanta**, v. 72, n. 5, p. 1767–72, 31 jul. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19071830>. Acesso em: 22 jan. 2013.

SHANMUGAM, S. **Enzyme technology**. [s.l.] I. K. International Pvt Ltd, 2009.

SHI, Q.; JACKOWSKI, G. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: HAMES, B. D. (Ed.). **Gel Electrophoresis of Proteins : A Practical Approach**. 2. ed. [s.l.] Oxford University Press, 1998. p. 13–33.

SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L. F. **Introduction to food toxicology**. [s.l.] Academic Press, 2009.

SIGMA-ALDRICH. **Technical bulletin**, 2013. .

SILVA, S. C. da; WISNIEWSKI, C.; LUCCAS, P. O.; MAGALHÃES, C. S. de. Enzyme from Banana (*Musa* Sp.) Extraction Procedures for Sensitive Adrenaline Biosensor Construction. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 04, n. 06, p. 293–300, 20 jun. 2013a. Disponível em: <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=33427&#abstract>. Acesso em: 21 mar. 2014.

SILVA, L. M. C.; MELLO, A. C. C.; SALGADO, A. M. Phenol determination by an amperométrico biosensor based on lyophilized mushroom (Agaricus bisporus) tissue. **Environmental Technology**, v. 35, n. 8, p. 1012–1017, 18 abr. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2013.858755>. Acesso em: 23 fev. 2014.

SILVA, L. M. C.; SALGADO, A. M.; COELHO, M. A. Z. Agaricus bisporus as a source of tyrosinase for phenol detection for future biosensor development. **Environmental technology**, v. 31, n. 6, p. 611–6, maio 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20540422>. Acesso em: 30 jan. 2014.

SILVA, L.; SANTOS, V. P. S.; SALGADO, A. M.; PEREIRA, K. S. Biosensors for Contaminants Monitoring in Food and Environment for Human and Environmental Health. p. 1–18, 2013b.
SILVA, M.; LIDON, F. Food preservatives - An overview on applications and side effects. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 28, n. 6, p. 1, 2016. Disponível em: <http://www.ejfa.me/?mno=223898>.
SILVA, M. M. do N. **Avaliação microbiológica e de benzeno em refrescos industrializados à base de guaraná**. 2016. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016.
SINGH, K. V; BHURA, D. K.; NANDAMURI, G.; WHITED, A. M.; EVANS, D.; KING, J.; SOLANKI, R. Nanoparticle-enhanced sensitivity of a nanogap-interdigitated electrode array impedimetric biosensor. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 27, n. 22, p. 13931–9, 15 dez. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21942636>. Acesso em: 31 jan. 2014.
SINGH, A.; POSHTIBAN, S.; EVOY, S. Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 2, p. 1763–86, jan. 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3649382&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 22 jan. 2014.
SROYSEE, W.; PONLAKHET, K.; CHAIRAM, S.; JARUJAMRUS, P.; AMATATONGCHAI, M. A sensitive and selective on-line amperometric sulfite biosensor using sulfite oxidase immobilized on a magnetite-gold-folate nanocomposite modified carbon-paste electrode. **Talanta**, v. 156, p. 154–162, 2016.
STADLER, R. H.; LINEBACK, D. R. **Process-induced food toxicants: occurrence, formation, mitigation, and health risks - richard h. stadler, david r. lineback**. 1 Edition ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008.
SUN, D.-W. **Handbook of food safety engineering**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2011. v. 3
TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Enzymes on material surfaces. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 93, p. 8–19, 1 maio 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776512000288>. Acesso em: 20 jan. 2014.
TANRISEVEN, A.; ULUDAĞ, Y. B.; DOĞAN, Ş. A novel method for the immobilization of glucoamylase to produce glucose from maltodextrin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 3, p. 406–409, mar. 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022902000042>. Acesso em: 6 fev. 2014.
TASKOVA, R. M.; ZORN, H.; KRINGS, U.; BOUWS, H.; BERGER, R. G. A comparison of cell wall disruption techniques for the isolation of intracellular metabolites from Pleurotus and Lepista sp. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 61, n. 5-6, p. 347–50, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16869491>.
TECHAKRIENGKRAI, I.; LERTBORWORNWONG, C. The analysis of benzene contaminant in Thai commercial non-alcoholic beverages by Headspace Gas Chromatography Mass Spectrometry. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 4, p. 1883–1887, 2013. Disponível em: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=19854668&AN=91515075&h=RWlE9pYKRZ7oIie6t7ZsJ3gMzhCO9k97i6d3Jzl%2FAU9QDDohtQ2WeVIy%2F6B2eXLFAQRF9dLz%2F%2FVYnofUiqz5Kg%3D%3D&crl=c>. Acesso em: 21 jan. 2014.

TFOUNI, S. A. V.; TOLEDO, M. C. F. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. **Food Control**, v. 13, p. 117–123, 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713501000846>. Acesso em: 4 fev. 2014.
THAKUR, M. S.; RAGAVAN, K. V. Biosensors in food processing. **Journal of food science and technology**, v. 50, n. 4, p. 625–641, ago. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24425965>. Acesso em: 23 fev. 2014.
THERON, M. M.; LUES, J. F. R. **Organic acids and food preservation**. 1 Edition ed. Bca Raton: CRC Press, 2010.
THÉVENOT, D.; TOTH, K.; DURST, R.; WILSON, G. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 121–131, 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566301001154>. Acesso em: 1 dez. 2013.
TOPÇU, S.; SEZGINTÜRK, M. K.; DINÇKAYA, E. Evaluation of a new biosensor-based mushroom (Agaricus bisporus) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. **Biosensors & bioelectronics**, v. 20, n. 3, p. 592–7, 15 out. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494244>. Acesso em: 17 dez. 2012.
TURNER, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 8, p. 3184, 2013. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3cs35528d>. Acesso em: 13 jun. 2016.
UPADHYAY, L. S. B.; VERMA, N. Enzyme Inhibition Based Biosensors: A Review. **Analytical Letters**, v. 46, n. June 2014, p. 225–241, 2012.
USI LIFE SCIENCE. **YSI 2700 SELECT Biochemistry Analyzer User's Manual**Yellow Springs, 2009. . Disponível em: <https://www.ysi.com/File Library/Documents/Manuals for Discontinued Products/YSI-2700-Select-Biochemistry-Analyzer-Manual-n.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2016.
VAN DORST, B.; MEHTA, J.; BEKAERT, K.; ROUAH-MARTIN, E.; DE COEN, W.; DUBRUEL, P.; BLUST, R.; ROBBENS, J. Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: a review. **Biosensors & bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1178–94, 15 dez. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20729060>. Acesso em: 3 jan. 2013.
VAN POUCKE, C.; DETAVERNIER, C.; VAN BOCXLAER, J. F.; VERMEYLEN, R.; VAN PETEGHEM, C. Monitoring the benzene contents in soft drinks using headspace gas chromatography-mass spectrometry: a survey of the situation on the belgian market. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4504–10, 25 jun. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18522398>.
VELUSAMY, V.; ARSHAK, K.; KOROSTYNSKA, O.; OLIWA, K.; ADLEY, C. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 2, p. 232–54, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20006978>. Acesso em: 30 out. 2012.
VINCI, R. M.; JACXSENS, L.; VAN LOCO, J.; MATSIKO, E.; LACHAT, C.; DE SCHAETZEN, T.; CANFYN, M.; VAN OVERMEIRE, I.; KOLSTEREN, P.; DE MEULENAER, B. Assessment of human exposure to benzene through foods from the Belgian market. **Chemosphere**, v. 88, n. 8, p. 1001–1007, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.044>. Acesso em: 23 mar. 2013.
VINCI, R. M.; MEULENAER, B. De; ANDJELKOVIC, M.; CANFYN, M.; OVERMEIRE, I. Van; LOCO, J. Van. Factors Influencing Benzene Formation from the Decarboxylation of Benzoate in Liquid Model Systems. p. 12975–12981, 2011.

VISWANATHAN, S.; RADECKA, H.; RADECKI, J. Electrochemical biosensors for food analysis. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v. 140, n. 8, p. 891–899, 15 abr. 2009. Disponível em: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00706-009-0143-5>. Acesso em: 22 jan. 2013.
WANG, J.; WANG, L.; DI, J.; TU, Y. Electrodeposition of gold nanoparticles on indium/tin oxide electrode for fabrication of a disposable hydrogen peroxide biosensor. **Talanta**, v. 77, n. 4, p. 1454–9, 15 fev. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19084664>. Acesso em: 2 fev. 2014.
WANG, Y.; YE, Z.; YING, Y. New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 3, p. 3449–71, jan. 2012. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3376556&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 27 jan. 2014.
WANG, Z.; ETIENNE, M.; URBANOVA, V.; KOHRING, G.-W.; WALCARIUS, A. Reagentless D-sorbitol biosensor based on D-sorbitol dehydrogenase immobilized in a sol-gel carbon nanotubes-poly(methylene green) composite. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 11, p. 3899–906, abr. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23462979>. Acesso em: 19 jan. 2014.
WARNER, M. **Pandora's lunchbox: how processed food took over the american meal**. [s.l.] Simon and Schuster, 2013.
WATSON, D. H. **Food chemical safety: additives**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2002.
WECK, A. L. de; BUNDGAARD, H. **Allergic reactions to drugs**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2012.
WEDGE, M. **A disease called childhood: why adhd became an american epidemic**. [s.l.] Penguin Publishing Group, 2015.
WEST, N.; BAKER, P.; WARYO, T.; NGECE, F. R.; IWUOHA, E. I.; O'SULLIVAN, C.; KATAKIS, I. Highly sensitive gold-overoxidized polypyrrole nanocomposite immunosensor for antitransglutaminase antibody. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 28, n. 2, p. 167–177, 5 fev. 2013. Disponível em: <http://jbc.sagepub.com/content/early/2013/02/03/0883911512472277>. Acesso em: 31 jan. 2014.
WHITEHURST, R. J.; OORT, M. Van. **Enzymes in food technology**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2009.
WHITFORD, D. **Proteins: structure and function**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2005.
WHO, W. H. O. **Benzoic acid and benzoate - Concise International Chemical Assessment Document 26Vasa**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/cicad26_rev_1.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2014.
WHO, W. H. O. **Foodborne disease outbreaks: Guidelines for investigation and controlVasa**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241547222_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 19 jan. 2014.
WICHERS, H. J.; GERRITSEN, Y. A. M.; CHAPELON, C. G. J. Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of Agaricus bisporus. **Phytochemistry**, v. 43, n. 2, p. 333–337, 1996. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942296003093>. Acesso em: 20 jan. 2014.
WILSON, K.; WALKER, J. M. **Principles and techniques of practical biochemistry**. 5. ed. [s.l.] Cambridge University Press, 2000.

YADAV, A.; KUMAR, A.; DAS, M.; TRIPATHI, A. Sodium benzoate, a food preservative, affects the functional and activation status of splenocytes at non cytotoxic dose. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 88, p. 40–7, fev. 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691515301253>. Acesso em: 29 maio. 2016.

YAM, K. L.; LEE, D. S. **Emerging food packaging technologies: principles and practice**. [s.l.] Elsevier Science, 2012.

YILDIZ, A.; ERDOGAN, S.; SAYDUT, A.; HAMAMCI, C. High-Performance Liquid Chromatography Analysis and Assessment of Benzoic Acid in Yogurt, Ayran, and Cheese in Turkey. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 3, p. 591–595, 23 ago. 2011. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-011-9288-z>. Acesso em: 19 jan. 2014.

ZENGIN, N.; YÜZBAŞIOĞLU, D.; UNAL, F.; YILMAZ, S.; AKSOY, H. The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. **Journal of Attention Disorders**, v. 49, n. 4, p. 763–9, abr. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21130826>. Acesso em: 20 jan. 2014.

ZHANG, DONG-HAO; YUWEN, LI-XIA; PENG, L.-J. Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

ZHANG, X.; FLURKEY, Wi. H. Phenoloxidases in Portabella Mushrooms. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 1, p. 97–100, jan. 1997. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04376.x>. Acesso em: 27 mar. 2014.

ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. **Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications (google ebook)**. [s.l.] Academic Press, 2011. v. 8

ZHANG, Y.; LIU, H.; YANG, Z.; JI, S.; WANG, J.; PANG, P.; FENG, L.; WANG, H.; WU, Z.; YANG, W. An acetylcholinesterase inhibition biosensor based on a reduced graphene oxide/silver nanocluster/chitosan nanocomposite for detection of organophosphorus pesticides. **Anal. Methods**, v. 7, n. 15, p. 6213–6219, 2015. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5AY01439E>. Acesso em: 13 jun. 2016.

ZHAO, Z.; JIANG, H. Enzyme-based electrochemical biosensors. In: PIER, A. S. (Ed.). **Biosensors**. [s.l.] InTech, 2010. p. 1–23.

ZHENG, H.; YIN, J.; GAO, Z.; HUANG, H.; JI, X.; DOU, C. Disruption of Chlorella vulgaris cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 164, n. 7, p. 1215–24, ago. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21347653>. Acesso em: 12 dez. 2013.

ZHOU, Y.; WANG, L.; WU, T.; TANG, X.; PAN, S. Optimal immobilization of β-glucosidase into chitosan beads using response surface methodology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, 2013.

ZOUROB, M. **Recognition receptors in biosensors**. [s.l.] Springer, 2010.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14139–14194, 2014. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/9/14139/>.

Anexo 1: Lista de ingredientes das versões convencional e de baixa caloria dos refrescos analisados (SILVA, 2016).

- **Amostra A:** Água, extrato natural de guaraná, açúcar, corante INS 150c, acidulante ácido cítrico INS 330, conservador benzoato de sódio INS 211, antioxidante ácido ascórbico INS 300.
- **Amostra A *diet*:** Água, extrato natural de guaraná, corante INS 150c, acidulante ácido cítrico INS 330, conservador benzoato de sódio INS 211, antioxidante ácido ascórbico INS 300, edulcorantes artificiais: sacarina sódica INS 954 (10,8mg/100mL), ciclamato de sódio INS 952 (22,4mg/100mL), aspartame INS 951 (1,8mg/100mL), acessulfame K INS 950 (3,2mg/100mL). Contém fenilalanina.
- **Amostra B:** Água filtrada, açúcar refinado, ácido cítrico (INS 330), corante caramelo III (INS 150c), extrato natural de guaraná, aroma natural de guaraná, ácido ascórbico (INS 300), conservador (INS 211).
- **Amostra B *diet*:** Água filtrada, corante natural de caramelo III 150c, extrato natural de guaraná, aroma natural de guaraná, ácido cítrico INS 133, ácido ascórbico INS 300, conservador INS 211, aspartame INS 951, acessulfame de potássio INS 950 e EDTA INS 385.
- **Amostra C:** Água tratada, açúcar, acidulante ácido cítrico (INS 330), corante caramelo IV (INS 150d), aroma idêntico ao natural de guaraná com extrato, conservadores sorbato de potássio (INS 202) e benzoato de sódio (INS 211).
- **Amostra C *diet*:** Água tratada, extrato natural de guaraná, aroma idêntico ao natural de guaraná, conservadores: benzoato de sódio (INS 211) e sorbato de potássio (INS 202), corante: caramelo I (INS 150 a), acidulante ácido cítrico (INS 330), antioxidante ácido ascórbico (INS 300), edulcorantes artificiais: ciclamato de sódio 0,025g/100 mL (INS 952) e sacarina sódica 0,0005g/100 mL (INS 954).