



**Estudo preliminar de método de análise
para detecção de *Streptococcus agalactiae*
em amostras de leite contaminado para
futura aplicação em um biossensor**

Ana Caroline Nunes Botelho

Dissertação de Mestrado

Orientadores:

Prof. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza, D. Sc.

Março de 2010

ANA CAROLINE NUNES BOTELHO

**Estudo preliminar de método de análise para detecção de
Streptococcus agalactiae em amostras de leite contaminado
para futura aplicação em um biossensor**

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

Orientação: Prof^ª. Andréa Medeiros Salgado

Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza

Rio de Janeiro

Março de 2010

**ESTUDO PRELIMINAR DE MÉTODO DE ANÁLISE PARA
DETECÇÃO DE *Streptococcus agalactiae* EM AMOSTRAS DE
LEITE CONTAMINADO PARA FUTURA APLICAÇÃO EM UM
BIOSENSOR**

Ana Caroline Nunes Botelho

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

Aprovado por:

Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.
(Orientadora)

Sergio Eduardo Longo Fracalanza, D. Sc.
(Co-orientador)

Suely Pereira Freitas, D.Sc.

Mônica Caraméz Triches Damaso, D. Sc.

Karen Signori Pereira, D. Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Março de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Botelho, Ana Caroline Nunes

Estudo preliminar de método de análise para detecção de *Streptococcus agalactiae* em amostras de leite contaminado para futura aplicação em um biossensor / Ana Caroline Nunes Botelho. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2010.

vii, p.; il.

(Dissertação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2010.

Orientador(es): Andréa Medeiros Salgado e Sergio Eduardo Longo Fracalanza

1. *Streptococcus agalactiae*. 2. Mastite Bovina. 3. Leite. 4. Dissertação. (Mestrado – UFRJ/EQ). 5. Andréa Medeiros Salgado.

I. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Durval e Maria Luisa e a minha querida avó Maria Nunes (in-memoriam).

Agradecimentos

À Deus por iluminar meus caminhos.

Aos meus pais, Durval e Luisa, por todas as oportunidades que me foram dadas, por respeitarem as minhas escolhas e pelo apoio incondicional. A vocês ofereço cada passo da minha vida e cada sucesso.

Ao Sergio, meu noivo, agradeço a amizade e amor compartilhados nesses anos. Companheiro em todos os momentos.

Aos meus irmãos Ana Maria e Diego, pela amizade.

A professora Andrea Medeiros Salgado, mestre. Aquele cuja dedicação a nós, seus pupilos, ao ensino, são uma inspiração. Companheira e sempre com uma palavra de apoio nos momentos de angústia.

Ao Prof. Sergio E. L. Fracalanza, pela paciência na hora das tantas perguntas, por ensinar, estimular, compartilhar e ser a definição viva de mestre.

As amigas do Laboratório de Sensores Biológicos: Lívia, Ariana, Gisele Costa, Giselle Cavalcanti, Gabi, Laís e Andreia, por todos os conhecimentos compartilhados em longas discussões sobre a vida acadêmica ou não. Momentos de alegrias, descontrações e lamentações foram inúmeros.

Aos amigos da pós e graduação: Patrícia, Andressa, Douglas e Tati.

A professora Eliana Flávia que me orientou no início da minha jornada.

Ao pessoal do Laboratório de Bacteriologia Médica: Marquinho, Armando, Aline, Moema, Juliana, por me garantirem boas gargalhadas e bons conselhos nos momentos de dificuldade.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Às demais pessoas que aqui não foram citadas, porém contribuíram de alguma forma para este trabalho.

“A coisa mais perfeita que podemos experimentar é o misterioso. É a fonte de toda arte e de toda ciência verdadeira.”

Albert Einstein

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

**ESTUDO PRELIMINAR DE MÉTODO DE ANÁLISE PARA
DETECÇÃO DE *Streptococcus agalactiae* EM AMOSTRAS DE
LEITE CONTAMINADO PARA FUTURA APLICAÇÃO EM UM
BIOSSENSOR**

Ana Caroline Nunes Botelho

Março, 2010

Orientadores: Prof. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.
Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza, D. Sc.

A mastite bovina consiste na inflamação da glândula mamária devido a uma injúria que pode ter diversas origens. A inflamação pode ser causada por agentes infecciosos, agentes físicos, ou irritantes químicos. As alterações no leite, como floculação e formação de coágulos são mais frequentes. O agro-negócio do leite representa papel importante na economia do país. Vários microrganismos podem causar mastite bovina, entre eles os *Streptococcus agalactiae*. A metodologia padrão de detecção desse microrganismo dura cerca de 36 horas. *S. agalactiae* produz um enzima chamada hipuricase, que quando reage com seu substrato (hipurato de sódio) observa-se a produção de ácido benzóico e glicina. O ácido benzóico é inibidor da enzima tirosinase. O sistema de transdução utilizado neste trabalho foi o eletrodo de oxigênio.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver preliminarmente um sistema para detecção de microrganismo diretamente do leite. A enzima utilizada neste trabalho foi extraída do cogumelo *Agaricus bisporus*. A presença de atividade enzimática da tirosina no leite foi evidenciada, sendo o melhor tempo de estabilização do eletrodo de 3 minutos, após 5 minutos de saturação de oxigênio e melhor concentração de L-tirosina foi de 144,95g/L e melhor concentração enzimática foi de 400U. Nestas condições, a concentração mínima detectada no sistema foi de 12,212 g/L, pelo processo de inibição competitiva.

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

**PRELIMINARY STUDY OF METHOD FOR DETECTION OF
S. agalactiae IN SAMPLES OF CONTAMINATED MILK FOR
FUTURE APPLICATION IN A BIOSENSOR**

Ana Caroline Nunes Botelho

Março, 2010

Supervisors: Prof. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.
Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza, D.Sc.

Bovine Mastitis is the inflammation of the cow's breast due to an injury that may have several origins. The inflammation can be caused by infectious agents, physical or chemical irritants. The changes in milk, such as flocculation and formation of clots are more frequent. Agri-business of milk represents important role in the economy. Several microorganisms can cause bovine mastitis, including the *Streptococcus agalactiae*. The standard methodology for detection of microorganism takes about 36 hours. The *S. agalactiae* produces an enzyme called hippuricase, which when reacted with its substrate (hippurate sodium) observed the production benzoic acid and glycine. The acid is an inhibitor the enzyme tyrosinase. The transduction system is used this work was the oxygen electrode. Therefore, objective was to develop preliminary a system for detecting the organism directly milk. The enzyme used in this study was extracted from *Agaricus bisporus*. The presence of activity enzyme tyrosine in milk was observed, and the best time to stabilize the lead 3 minutes, after 5 minutes

of oxygen saturation and better concentration of L-tyrosine was 144,95g/L and more enzyme concentration was 400U. The minimum concentration detected in the system was 12,212 g/L, on the process of competitive inhibition.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Capítulo 1 - INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 - Considerações gerais | 1 |
| Capítulo 2 - OBJETIVOS | 7 |
| 2.1 - Objetivo geral | 7 |
| 2.2 - Objetivos específicos | 7 |
| Capítulo 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 8 |
| 3.1 – O Leite | 8 |
| 3.2 – O agente etiológico: <i>Streptococcus agalactiae</i> | 8 |
| 3.3. – A doença: Mastite | 10 |
| 3.4. – Métodos de controle de qualidade do leite | 13 |
| 3.5. – Tirosinase | 15 |
| 3.5.1. – Características gerais da enzima | 15 |
| 3.6. – Biossensores | 18 |
| 3.6.1. – Biossensores Enzimáticos | 23 |
| 3.4.2. – Métodos de Imobilização aplicados em biossensores | 25 |
| 3.4.3. –Biossensores eletroquímicos | 27 |
| 3.7. – Aplicação dos biossensores | 33 |
| 3.8. – Biossensores na área de alimentos | 37 |
| Capítulo 4 – MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 4.1 – Equipamentos | 43 |
| 4.2 - Biocomponente: enzima tirosinase obtida de tecido fúngico | 43 |
| 4.3. - Métodos analíticos | 44 |
| 4.3.1. – Procedimento de extração da tirosinase | 44 |
| 4.3.2. – Procedimento de dosagem da atividade enzimática dos extratos | 44 |
| 4.3.3. – Determinação da atividade tirosinásica no leite | 45 |
| 4.3.4. - Determinação da melhor diluição da amostra - Leite | 46 |
| 4.3.5. - Determinação do tempo de estabilização do eletrodo | 47 |
| 4.3.6. - Determinação da melhor concentração de substrato (L-tirosina) | 47 |
| 4.3.7. - Determinação da melhor concentração de enzima (tirosinase) | 48 |
| 4.3.8 - Determinação do melhor tempo de resposta | 49 |
| 4.3.9 - Determinação do intervalo de concentrações de ácido benzóico | 49 |

| | |
|--|----|
| Capítulo 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO | 52 |
| 5.1. - Extração e determinação da atividade enzimática da tirosinase | 52 |
| 5.2.- Determinação da atividade tirosinásica no leite | 54 |
| 5.3. - Seleção da melhor diluição da amostra de leite | 56 |
| 5.4. - Seleção do melhor tempo de estabilização do eletrodo e da concentração inicial de oxigênio dissolvido | 58 |
| 5.5. - Determinação do melhor tempo de resposta | 60 |
| 5.6. - Determinação da melhor concentração de enzima e melhor concentração de substrato | 63 |
| 5.7. - Determinação do intervalo de concentração em que se observa inibição enzimática pelo ácido benzóico | 67 |
| Capítulo 6 - CONCLUSÕES | 73 |
| Capítulo 7 - SUGESTÕES | 76 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 77 |

SUMÁRIO DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|-----------|
| Figura 1 | Esquema do grupo prostético da tirosinase | 17 |
| Figura 2 | Esquema geral de funcionamento de um biossensor | 19 |
| Figura 3 | Classificação dos biossensores de acordo com o elemento biológico sensível | 22 |
| Figura 4 | Exemplos Esquemáticos dos Métodos de Imobilização Enzimática. | 26 |
| Figura 5 | Eletrodo de oxigênio dissolvido comercial. | 32 |
| Figura 6 | Esquema resumido da proposta do presente trabalho | 42 |
| Figura 7 | Atividade enzimática (U/mL) dos lotes de cogumelos usados no trabalho. | 53 |
| Figura 8 | Gráfico evidenciando a atividade tirosinásica no leite | 55 |
| Figura 9 | Efeito da diluição (1:2) na atividade enzimática. | 57 |
| Figura 10 | Efeito da diluição (1:10) na atividade enzimática | 57 |
| Figura 11 | Estudo do melhor tempo de estabilização do eletrodo e da concentração de oxigênio dissolvido (mg/L). | 59 |
| Figura 12 | Resultados do teste visando escolha do melhor tempo de resposta (3 min de estabilização + tempo de resposta) de 5, 6, 7, 8, 9 e 10 min. | 60 |
| Figura 13 | Resultados do teste visando escolha do melhor tempo de resposta (3 min de estabilização + tempo de resposta) de 11, 12, 13, 14 e 15 min. | 61 |
| Figura 14 | Resultados do teste visando escolha do melhor tempo de resposta (3 min de estabilização + tempo de resposta) de 16, 17, 18, 19 e 20 min. | 61 |
| Figura 15 | Resultados das variações de oxigênio dissolvido (mg/L) relativos à concentração enzimática de 200U/mL. | 65 |
| Figura 16 | Resultados das variações de oxigênio dissolvido (mg/L) relativos à concentração enzimática de 400U/mL. | 65 |
| Figura 17 | Resultado dos testes de inibição adicionando o inibidor após 10 minutos do início da reação enzimática | 68 |
| Figura 18 | Resultado dos testes de inibição adicionando o inibidor juntamente com a enzima e o substrato. | 69 |

SUMÁRIO DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|-----------|
| Tabela 1 | Comparação entre os componentes biológicos usados em biossensores, mostrando suas vantagens e desvantagens. | 25 |
| Tabela 2 | Biossensores amperométricos para análise de compostos fenólicos a base de tecidos e célula. | 30 |
| Tabela 3 | Biossensores disponíveis ou em desenvolvimento por empresas para análise da qualidade de alimentos. | 41 |
| Tabela 4 | Tabela com os resultados das variações de oxigênio dissolvido (mg/L) relativos à atividade enzimática para as duas concentrações enzimáticas testadas (200U/mL e 400U/mL) | 64 |

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

A indústria de alimentos é uma associação complexa e ampla em diversas atividades. Seu principal objetivo é contribuir para a segurança alimentar (conceito amplo que envolve qualidade e disponibilidade) e a produção de alimentos saudáveis, saborosos, inócuos e disponíveis. Os componentes de tais atividades incluem o aprimoramento e desenvolvimento de variedades de animais e, sobretudo, de plantas, e maior eficiência na agricultura ecologicamente sustentável e altamente produtiva, o processamento dessas matérias-primas para produzir alimentos estáveis, a distribuição dos alimentos até o consumidor final com todas as garantias de um produto seguro, nutritivo e saboroso. Por isso o controle de qualidade na indústria de alimentos é muito importante (PESSANHA, 2001).

Desde a Antiguidade, o leite tem sido utilizado como alimento pelo homem. Atualmente, seu consumo apresenta uma taxa de crescimento constante, principalmente de produtos derivados como iogurte e queijos. Durante o século XIX, o leite fresco era um alimento somente fornecido para as crianças. Após a constatação de seus benefícios, houve a difusão do produto para consumo de adultos. Os mais importantes avanços na utilização do leite ocorreram na metade do século XX com a descoberta da importância das vitaminas. O leite é uma mistura de proteínas, carboidratos, gorduras, sais minerais e água. Trata-se de um alimento altamente perecível e que depende de altos custos para sua conservação após ser produzido (BRITO *et al*, 2001).

O Brasil é o sexto maior produtor de leite do mundo e cresce a uma taxa anual de 4%, superior à de todos os países que ocupam os primeiros lugares. Respondemos por 66% do volume total de leite produzido nos países que compõem o Mercosul. Pode-

se avaliar a importância relativa do produto lácteo no contexto do agro-negócio nacional pelo faturamento de alguns produtos da indústria brasileira de alimentos na última década, registrando 248% de aumento contra 78% de todos os segmentos. Em 2002, o Valor Bruto da Produção Agropecuária foi de 91 bilhões de reais. Destes, aproximadamente 38 bilhões de reais são de produtos pecuários, tendo o leite posição de destaque, com o valor de 6,7 bilhões de reais, ou 17% do Valor Bruto da Produção Pecuária, superado apenas pelo Valor da Produção da carne bovina. O leite está entre os seis primeiros produtos mais importantes da agropecuária brasileira, ficando à frente de produtos tradicionais como café beneficiado e arroz. O agro-negócio do leite e seus derivados desempenham um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população. Para cada real de aumento na produção no sistema agroindustrial do leite, há um crescimento de, aproximadamente, cinco reais no aumento do Produto Interno Bruto (PIB) o que coloca o agro-negócio do leite à frente de setores importantes como o da siderurgia e o da indústria têxtil (EMBRAPA, 2003; LEE *et al.*, 2008).

A mastite bovina consiste na inflamação da glândula mamária devido a uma injúria que pode ter diversas origens. A inflamação pode ser causada por agentes infecciosos, agentes físicos (trauma), ou agentes químicos (EBERHART *et al.*, 1987; KEEFE *et al.*, 1997). Em propriedades de exploração leiteira, grande parte dos quadros de mastite está associada aos microrganismos, os quais invadem os tetos, se multiplicam e produzem toxinas que são grandes responsáveis pelo dano tecidual. A espécie *Streptococcus agalactiae* (sorogrupo B) é também reconhecida pela sua associação com quadros infecciosos em animais, destacando-se a mastite bovina (EBERHART *et al.*, 1987; KEEFE, 1997). A apresentação dos quadros de mastite varia amplamente quanto à gravidade, dependendo, em parte, do tipo de microrganismo infectante. A mastite

subclínica consiste em infecção do úbere sem alterações visíveis tanto do órgão quanto do leite. A presença de microrganismos pode ser demonstrada através de cultura e as mudanças na qualidade do leite, devido ao quadro inflamatório, podem ser detectadas por testes específicos. Em várias propriedades de exploração leiteira, o tipo de apresentação clínica é aquela com maior prevalência e a principal responsável por grande parte da redução na produção de leite. Como esta forma de mastite não é evidente na maioria dos casos, a extensão da infecção geralmente é desconhecida. As alterações no leite, como floculação e formação de coágulos são mais frequentes. O aumento da temperatura do úbere, intumescimento e sensibilidade do mesmo estão ausentes ou são suaves. Em relação à mastite clínica, esta consiste na observação visível da anormalidade do úbere e/ou secreção. Há um início repentino de intumescimento, aumento da temperatura, enrijecimento e sensibilidade nos tetos afetados. O leite apresenta uma aparência anormal e o rendimento é reduzido bruscamente (EBERHART *et al.*, 1987; KEEFE, 1997).

O controle de qualidade do leite pode ser realizado sob dois aspectos principalmente: controle da qualidade microbiológica e controle da qualidade química (relacionada com a composição). Em ambos os casos, para se fazer as análises é necessário alto investimento e tempo.

O método padrão para o diagnóstico da colonização por *S. agalactiae* consiste da cultura do material clínico (leite) em meio seletivo que inibe o crescimento de outros microrganismos o que requer cerca de 36 horas (BAKER, 1977). Estes entraves funcionam como incentivo para o desenvolvimento de novas tecnologias, que otimizem as análises e as tornem economicamente viáveis. Os biossensores surgem como uma promissora alternativa para esses entraves (LEE *et al.*, 2008).

Biossensores são dispositivos que utilizam estruturas como enzimas, anticorpos, DNA, entre outros, cuja função é determinar, de forma seletiva, as concentrações de diversas substâncias. Seu potencial de aplicação é amplo, de modo que nos últimos anos pesquisas vêm sendo desenvolvidas em várias partes do mundo no sentido de aperfeiçoar esta tecnologia. Um biossensor pode ser definido como um sensor que combina a atividade seletiva de um elemento biológico sensível ao analito de interesse, ligado a um transdutor que converte o sinal biológico em um sinal elétrico proporcional a concentração do analito. Ele deve possuir algumas características desejáveis como, por exemplo: seletividade, faixa de sensibilidade adequada, acurácia e precisão, tempo de vida útil maior possível, frequência de amostragem também maior possível, reprodutibilidade, baixo custo e pequeno tamanho (ROSSATO, 2000).

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

Os problemas de estabilidade e a falta de credibilidade dos biossensores para aplicação em algumas áreas são ainda grandes desafios que contribuem para a escassez destes instrumentos no mercado. No entanto, esforços têm sido realizados buscando melhorar a confiança de modo a obter um sensor com o desempenho desejado em

termos de sensibilidade, alcance dinâmico e reprodutibilidade (KISSINGER *et al.*, 2005).

Os biossensores baseados na detecção da inibição da atividade do componente biológico têm sido uma saída para sistemas complexos de detecção de analitos de interesse (SALGADO, 2001).

No desenvolvimento de um biossensor uma das etapas preliminares fundamentais consiste na seleção do componente biológico, de modo que este seja específico para a determinação e a partir do produto que este gere a escolha do transdutor adequado, dentro da faixa de medida requerida.

No desenvolvimento desta dissertação buscou-se determinar, de forma preliminar, qual o componente biológico e o método de transdução a serem testados e usados para determinação de *Streptococcus agalactiae* presente em amostras de leite, visando futuramente o desenvolvimento de um biossensor que poderá ser usado para esta finalidade. O componente biológico utilizado foi a enzima polifenol oxidase, mais especificamente a tirosinase. Esta enzima vêm sendo bastante pesquisada nos últimos anos (DANTONI *et al.*, 1998; NISTOR *et al.*, 1999; ROSATTO, 2000; TOPÇU *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2004; CARRALERO *et al.*, 2006; TEMBE *et al.*, 2007; KOCHANA *et al.*, 2008a; KOCHANA *et al.*, 2008b; ZEJLI *et al.*, 2008). A tirosinase possui ampla distribuição na natureza, estando presente em vários seres vivos (SANCHEZ-FERRER *et al.*, 1995). Esta enzima é capaz de catalisar a oxidação de compostos aromáticos utilizando apenas o oxigênio molecular como agente oxidante, gerando um produto que possui uma coloração escura – as quinonas (CESTARI *et al.*, 2002; FATIBELLO - FILHO & VIEIRA, 2002; MARIN - ZAMORA *et al.*, 2006).

Amostras de leite contendo *S. agalactiae* possuem em sua composição a enzima hipuricase, produzida por estes, e que na presença de um substrato (hipurato de sódio) geram ácido benzóico que atua como inibidor da atividade da tirosinase. Quanto menor a atividade enzimática da tirosinase menor o consumo de oxigênio, já que estas enzimas usam oxigênio molecular como agente oxidante. Desta forma, a detecção do oxigênio presente nas amostras, usando como sistema de transdução um eletrodo de O₂, permite correlacionar à atividade da tirosinase à presença ou ausência de ácido benzóico, e conseqüentemente a presença ou ausência da enzima hipuricase, produzida por *S. agalactiae* presente em amostras de leite contaminadas por mastite. Portanto, o método permite detectar mais rapidamente a qualidade do alimento sob este aspecto.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral desenvolver preliminarmente um sistema analítico para detecção de um subproduto metabólico do *Streptococcus agalactiae* a fim de detectá-lo em amostras de leite visando o monitoramento da qualidade do mesmo.

2.2. Objetivos Específicos

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

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

2.2.2. Medida da atividade enzimática presente no tecido fúngico;

2.2.3. Seleção da melhor diluição da amostra de leite para realização dos testes;

2.2.4. Seleção do melhor tempo de estabilização do eletrodo e da concentração inicial de oxigênio dissolvido;

2.2.5. Determinação da melhor concentração enzimática (tirosinase) no leite;

2.2.6. Determinação da melhor concentração de L-tirosina (substrato) para realização dos testes;

2.2.7. Determinação do intervalo de concentração em que se observa inibição enzimática pelo ácido benzóico;

CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O Leite

O leite contém aproximadamente 87% de água, é uma mistura homogênea de diferentes substâncias, umas em emulsão, como as gorduras e outras dissolvidas como a lactose, as vitaminas hidrossolúveis, proteínas, sais, entre outras. A gordura é seu componente mais variável, pois há grande diferença conforme a raças e também as diversas estações do ano. Sua composição química também é variável segundo a raça do gado, época do ano e o tipo de alimentação. Sua diversificada composição, em que entram proteínas, gorduras e glicídeos o tornam um alimento recomendado para consumo da população. Existem inúmeros estudos avaliando a influência do leite na evolução de doenças, como câncer e arteriosclerose, além da sua contribuição na diminuição do colesterol (SILVA *et al.*, 1997).

O Brasil é o sexto maior produtor de leite do mundo, sendo superado somente para os Estados Unidos, Índia, China, Rússia e Alemanha. Sob o aspecto de consumo, o Brasil apresenta o segundo maior mercado consumidor de produtos lácteos na América Latina, perdendo apenas para a Argentina e quinto no ranking mundial (EMPRAPA, 2008).

3.2. Agente etiológico: *Streptococcus agalactiae*

Os microrganismos pertencentes à espécie *Streptococcus agalactiae* são parasitas obrigatórios de membranas mucosas, distribuídos em sítios como o trato gastrointestinal e genito-urinário de seres humanos e de vários animais (HARDIE & WHILEY, 1997). Apesar da possibilidade de estabelecimento de uma relação comensal com o hospedeiro, estes microrganismos podem causar quadros infecciosos quando

introduzidos em sítios normalmente estéreis em hospedeiros previamente saudáveis ou em pacientes com algum tipo de condição debilitante.

Assim como nos outros membros do gênero, a parede celular de *S. agalactiae* é constituída por peptidoglicana, vários carboidratos, ácido teicóico e proteínas (KILIAN, 1998). Estes compostos assumem um arranjo semelhante a uma estrutura em camadas não bem delimitadas, onde a peptidoglicana constituiria a camada mais interna e significativa. Açúcares aminos, glicosamina e ácido murâmico estão presentes na composição da peptidoglicana, assim como açúcares redutores como glicose, galactose e ramnose. Em relação à composição antigênica de substância grupo-específica da parede celular, as amostras da espécie *S. agalactiae* apresentam constituintes específicos que correspondem a um polissacarídeo com uma estrutura principal composta por ramnose, glicose e fosfato, e cadeias laterais trissacarídicas compostas por ramnose, galactose e *N*-acetilglucosamina ligados na posição 4 de uma ramnose presente na estrutura principal do polissacarídeo (PRITCHARD, GRAY & DILLON, 1984). Este composto constitui o antígeno de grupo B, do sistema de classificação de Lancefield, e pode ser extraído através do tratamento de culturas com ácido clorídrico a quente (LANCEFIELD, 1933). A detecção do antígeno do grupo B em amostras da espécie *S. agalactiae*, através da reação com anti-soro específico, permite a diferenciação de microrganismos desta espécie dos outros membros do gênero *Streptococcus*.

Algumas outras estruturas da parede celular, ou a ela associadas, de natureza polissacarídica e/ou protéica, e a presença de cápsula polissacarídica com composição variável servem como base para a tipagem sorológica (LANCEFIELD, 1934) e também apresentam um papel significativo em estudos epidemiológicos e de patogenicidade da espécie *S. agalactiae* (WESSELS *et al.*, 1989; KILIAN, 1998).

O *Streptococcus agalactiae* produz uma enzima chamada de hipuricase que quando reage com seu substrato, o hipurato de sódio, forma ácido benzóico e glicina. Esse teste é muito importante nos laboratórios até hoje e representa um importante teste para a identificação presuntiva do *S. agalactiae* (FACKLAM, R.R., & ELLIOTT, J. 1995). Foi baseado nesse teste que o trabalho foi desenvolvido.

3.3 A doença: Mastite

Vários microrganismos podem causar mastite bovina, entre eles *S. agalactiae*. Estes microrganismos são bem adaptados à sobrevivência no úbere e freqüentemente estabelecem infecções suaves sub-clínicas de longa duração. A transmissão destes patógenos ocorre pelo contato entre vacas ou através do contato com leite contaminado e/ou utensílios infectados como aqueles utilizados por ordenhadores ou máquinas operadoras. *S. agalactiae* penetram através do canal do úbere, atingem a cisterna glandular por contigüidade de líquidos e infectam primariamente o sistema de canais da porção inferior do teto, mas podem se disseminar amplamente e causar dano tecidual em toda glândula (KEEFE, 1997). O tubo infectado sofre intumescimento devido ao processo inflamatório e este processo junto com os debrís teciduais e leucócitos, eventualmente, podem levar à obstrução do canal, bloqueando a drenagem dos tecidos produtores de leite. O leite acumula-se nestas regiões, resultando em involução, cicatrização e redução da produção leiteira. Se o tratamento for administrado em período adequado, e se houver estímulo do úbere e o esvaziamento completo durante a ordenha, as obstruções são removidas e a área afetada é restaurada (KEEFE, 1997). Se a infecção persistir, a mastite por *S. agalactiae* pode se tornar uma infecção crônica, com períodos ocasionais de intensificação. O acúmulo de debrís bacterianos intensifica a resposta inflamatória e resulta na perda do tecido produtor de leite, reduzindo, desta

forma, a quantidade de leite produzido. Os estreptococos do grupo B raramente causam doenças graves, mas a fibrose extensa nos tecidos pode resultar em lactações subsequentes não produtivas. Isto ocorre, pois a contínua ação irritante destes microrganismos sobre a mucosa, durante uma ou várias lactações, provoca progressiva atrofia do epitélio secretor. A inflamação da glândula mamária resulta também, em adição à redução da produção de leite, em alterações na composição do leite (EBERHART *et al.*, 1987; KEEFE, 1997). O grau destas alterações depende da gravidade e duração da infecção. Estas podem incluir um aumento de células somáticas, mudanças nos tipos de proteínas presentes, como redução da quantidade de caseína e aumento na quantidade de proteínas séricas – alteração na quantidade de íons, mudança de pH e nas quantidades de lipídios. Estas alterações na composição do leite produzido afetam diretamente a qualidade e o rendimento dos subprodutos e derivados do leite. Como exemplo, a presença de uma grande quantidade de ácidos graxos livres no leite é inibidora de culturas utilizadas em processos de fermentação para a produção de laticínios (EBERHART *et al.*, 1987).

Atualmente, a mastite bovina permanece como uma das doenças com maior influência sobre a produção leiteira, com ambas as apresentações tendo conseqüências significativas sobre o rendimento. Antes da década de 1950-60, os cálculos das perdas econômicas baseavam-se principalmente sobre a perda imediata do leite causada pela mastite clínica. Nas décadas subsequentes, ficou evidenciado que as mastites sub-clínicas causavam prejuízos econômicos maiores, levando-se em conta a sua alta frequência nos rebanhos e a longa persistência inaparente de infecções nas glândulas mamárias (LANGENEGGER, VIANI & BAHIA, 1981; YAMAGATA *et al.*, 1998).

A mastite também é considerada uma das doenças mais importantes que acometem os rebanhos de caprinos leiteiros. Atribui-se a ela perdas na produção e,

consequentemente, prejuízos econômicos ao produtor e à indústria (FONSECA & SANTOS, 2000).

Em pequenos ruminantes, principalmente em cabras exploradas para a produção de leite, a mastite é um grave problema tanto por aumentar os custos da produção quanto pelos riscos à saúde pública. Além disso, a mastite caprina, particularmente a forma sub-clínica, representa um problema diagnóstico, principalmente em regiões onde não se dispõe de pessoal e equipamentos especializados, uma vez que a grande quantidade de células epiteliais e partículas anucleadas presentes no leite interfere significativamente com os testes de rotina utilizados para detectar a forma sub-clínica da doença. Vários estudos têm indicado e confirmado diferenças fisiológicas e microbiológicas entre a glândula mamária caprina e a bovina, demonstrando que devem ser realizadas adaptações para caprinos, dos testes diagnósticos empregados em leite bovino (PERRIN *et al.*, 1997).

Os prejuízos econômicos são decorrentes da redução da produção de leite, redução do período de gestação, perigo de transmissão da mastite para outros animais, demanda de maior tempo no manejo higiênico e substituição dos indivíduos cronicamente afetados. As perdas na produção de leite de cabras portadoras de mastite sub-clínica, de acordo com o grau de infecção, variam de 55 a 132 kg de leite/ano e uma perda de 3g de gordura/kg leite por animal (BAUDRY *et al.*, 1997).

Existem vários fatores predisponentes que levam o animal a ter mastite, entre esses, o leite que fica no úbere devido à ordenha incompleta, principalmente aquele que fica na cisterna do teto e que se constitui num excelente meio de cultura para multiplicação de microrganismos. Da mesma forma, a falta de higiene na ordenha e a limpeza e anti-sepsia do úbere estão entre os principais fatores que colaboram para a instalação de mastites (KRUG *et al.*, 1990).

Assim como no tratamento de infecções em seres humanos, a antibioticoterapia consiste em uma importante ferramenta de programas de saúde no controle de infecções intramamárias em gado de leite. O tratamento eficiente de mastite clínica requer um conhecimento prévio do microrganismo infectante e da prevalência de resistência a antimicrobianos de patógenos isolados da glândula mamária (GUÉRIN-FAUBLÉE *et al.*, 2002).

No entanto, a prevenção da mastite por *S. agalactiae*, tanto bovina como caprina, seria o método mais desejável, particularmente através da utilização de vacinas polivalentes. Para isso, um diagnóstico rápido, específico e capaz de caracterizar de forma abrangente o agente etiológico é fundamental.

Streptococcus agalactiae também tem se mantido como uma das principais causas de septicemia e meningite bacteriana em neonatos (YANCEY *et al.*, 1996). Além disso, sua importância como causa de infecções graves em pessoas idosas ou imunocomprometidas vem se destacando ao longo do tempo. A profilaxia com antibióticos, através de administração intra-parto, tem sido largamente utilizada para a prevenção das doenças perinatais por *S. agalactiae*, mas esta estratégia é motivo de críticas, pois pode aumentar o risco de infecções por outros microrganismos resistentes aos antibióticos (BLOCK *et al.*, 2008).

3.4 - Métodos de Controle de Qualidade do Leite

O controle de qualidade do leite pode ser avaliado sob dois aspectos: o controle de qualidade químico e controle de qualidade microbiológico. O controle de qualidade químico do leite refere-se à pesquisa de componentes que não deveriam estar presentes no produto, como por exemplo: antibióticos, uréia, pesticidas ou a determinação da

própria composição do leite. O controle de qualidade microbiológico refere-se à pesquisa e contagem de microrganismos. O controle da qualidade do leite inicia-se no processo de produção da fazenda: aquisição e manutenção de animais saudáveis e um manejo higiênico e sanitário adequados. Nas etapas seguintes de industrialização, distribuição e comercialização, são inúmeros os cuidados que devem ser tomados, devendo-se fazer um esforço integrado e conjunto para garantir a qualidade do produto final. A contaminação do leite pode ocorrer de várias maneiras: durante a ordenha, no processamento com equipamentos inadequados, devido à falta de limpeza e higiene dos recipientes, devido ao estado de saúde dos animais assim como várias outras formas. Alguns fatores como, por exemplo, o estado de saúde dos animais, irão atingir de forma direta o ser humano, podendo provocar doenças como a tuberculose, a brucelose e a leptospirose (JAYARAO *et al.*, 2004; FURTADO *et al.*, 2008).

O método comercial padrão para o diagnóstico da colonização por *S. agalactiae* consiste da cultura do material clínico (leite) em meio seletivo que inibe o crescimento de outros microrganismos (BAKER, 1977). Entretanto este método requer ao menos 36h, porque o meio precisa ser incubado entre 18 e 24 h e então sub-cultivado em placas agar sangue e o microrganismo identificado através de reações sorológicas, como métodos de aglutinação. Caso sejam utilizadas técnicas fenotípicas convencionais, um tempo ainda maior será necessário (YANCEY *et al.*, 1996). Por outro lado, vários métodos para a detecção rápida direta ou indireta de *S. agalactiae* têm sido desenvolvidos. As metodologias indiretas envolvem especialmente a detecção de antígenos. Existem também técnicas baseadas na tecnologia de DNA e são bastante difundidas, mas são caras, não são tão lentas quanto a técnica padrão e necessitam de operadores treinados (LEE *et al.*, 2008).

3.5. Tirosinase

3.5.1- Características Gerais da Enzima

As polifenoloxidades (PFO) formam um grupo de enzimas oxidorreduzases capazes de catalisar a oxidação de compostos fenólicos, reagindo com o oxigênio sem a necessidade de co-substratos. O grupo é dividido em duas subclasses: lacases e tirosinases (DURÁN & ESPOSITO, 2000).

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

As tirosinases (polifenol oxidase; monofenol monoxigenase, catecol oxidase, EC 1.14.18.1) são enzimas que estão amplamente distribuídas na natureza, estando presentes ao longo de toda a escala filogenética desde as simples bactérias até os grandes mamíferos (FENOLL *et al.*, 2001). Estão diretamente ligadas à fase proximal na cadeia da melanogênese e são responsáveis pelos fenômenos de pigmentação em mamíferos e de escurecimento em cortes vegetais (VAN GELDERY *et al.*, 1997). Isto é, essa enzima catalisa a oxidação da L-tirosina para seu correspondente dopaquinona. A polimerização do último resulta na formação da melanina (FARIA *et al.*, 2007).

Vários trabalhos já foram publicados utilizando tirosinase obtida a partir de diferentes fontes - cogumelos, vegetais, frutas, legumes, além de epiderme de pós-tumores e *Neurospora crassa* (ROS *et al.*, 1994; SEO *et al.*, 2003; VIEIRA *et al.*, 2004; KOCHANA *et al.*, 2008; SILVA, SALGADO & COELHO, 2010). Através desses estudos, observou-se que, independentemente da fonte, as tirosinases mantinham suas características funcionais e apresentavam estruturas semelhantes. O primeiro trabalho de investigação bioquímica com a tirosinase data de 1895, tendo sido realizado com o cogumelo *Russula nigrans*, cujos cortes expostos ao ar tornavam-se vermelhos e depois negros (SANCHEZ - FERRER *et al.*, 1995; FARIA, 2008). Em plantas e fungos, as tirosinases ocorrem em várias isoformas: formas imaturas, formas maduras e latentes e formas ativas. Sabe-se que existem estas isoformas, no entanto, não foi estabelecida a relação entre a descrição bioquímica e as características cinéticas destas (WHICHERS *et al.*, 1996). Segundo Van Gelder e colaboradores (1997), em cogumelos, aparentemente, 99% do total desta enzima estão presentes sob a sua forma latente. Além disso, Bevilaqua (2000) observou que o envelhecimento do cogumelo deve ser responsável pela ativação destas formas latentes da tirosinase, visto que o extrato obtido de cogumelos envelhecidos apresentou um aumento de 48% na atividade enzimática em relação ao lote de cogumelos mais jovens (lote controle).

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

quaternárias dessa enzima são diferentes, como por exemplo, em *Amanita muscaria*, a tirosinase apresenta-se na forma de heterodímero com massa molecular de aproximadamente 50kDa (MULLER *et al.*, 1996 *apud* FARIA, 2008).

O grupo prostético da enzima, mostrado na Figura 1, possui estrutura semelhante ao da hemocianina, contendo dois átomos de cobre e sendo composto por dois sítios de ligação para aromáticos e um sítio de ligação para oxigênio que está relacionado aos átomos metálicos (BEVILAQUA, 2000).

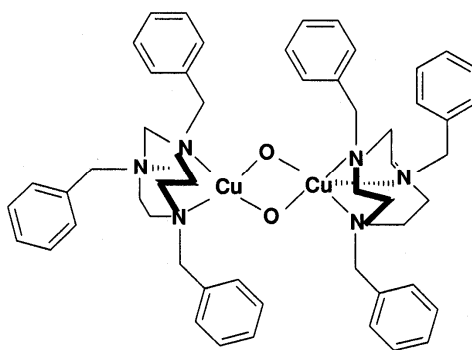


Figura 1: Esquema do grupo prostético da tirosinase (PRIMO, 2006).

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

Durante a reação de oxidação de difenóis ocorre a inativação irreversível da tirosinase. Na literatura, este fenômeno é denominado por alguns autores de inativação suicida (ATLOW *et al.*, 1984; BURTON *et al.*, 1998). A inativação ocorre quando o produto da transformação catalisada por esta enzima reage com a mesma. Segundo Escribano *et al.* (1989, *apud* KAMEDA, 2003), durante a reação de oxidação de difenóis a orto-quinonas ocorre a inativação irreversível da tirosinase por catecol. A inativação suicida da tirosinase também poderia ser resultado da reação de orto-quinonas com resíduos nucleofílicos próximos ao centro ativo da enzima. Sanchez-Ferrer e colaboradores (1995) consideraram mais plausível a hipótese da inativação por ataque de ligantes do cobre (radical hidroxil gerado durante a reação), pois a inativação da tirosinase ocorre mesmo na presença de agentes de redução que removam as quinonas. O ácido benzóico é um outro inibidor da atividade tirosinásica e atua competindo com o sítio ativo da enzima (MARQUES & YAMANAKA, 2008).

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

3.6. Biossensores

Os biossensores são definidos como qualquer dispositivo de detecção que incorpore tanto um organismo vivo ou produtos derivados de sistemas biológicos (enzimas, anticorpos, DNA, outros), como um transdutor que fornece a indicação, sinal ou outra forma de reconhecimento de uma substância específica (SALGADO, 2001).

Devido a grande quantidade de definições na literatura, recentemente a Union of Pure Applied Chemistry (IUPAC - 2001) propôs uma definição para Biossensores eletroquímicos: “*Um biossensor é um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica quantitativa ou semi-quantitativa através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que esta em contato direto com o elemento transdutor.*”.

Os biossensores são constituídos, essencialmente, de elemento biológico, transdutor e do sistema de tratamento e amplificação do sinal elétrico gerado, que muitas vezes está presente no próprio transdutor usado (Figura 2).

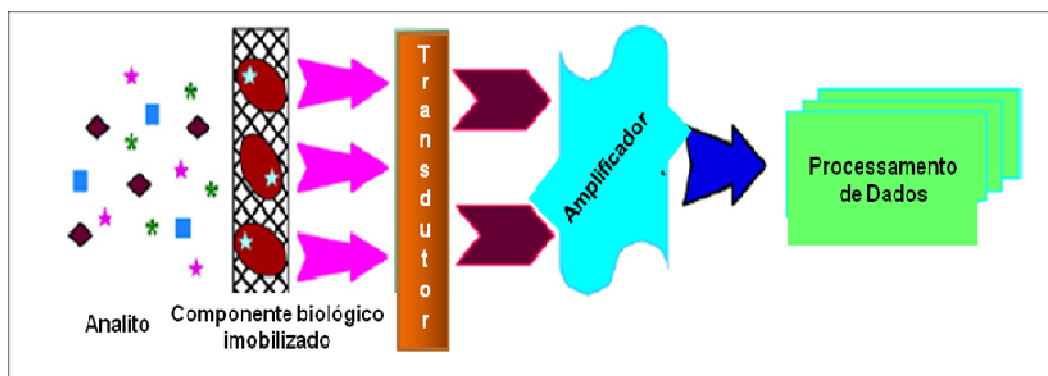


Figura 2: Esquema geral de funcionamento de um biossensor (MELO, 2008).

O elemento biológico ou o elemento sensor tem a propriedade de reconhecer seletivamente e interagir com o analito. Podem ser empregados na superfície do sensor microrganismos ou materiais oriundos de organismos como anticorpos, ácido nucléico, células, organelas, proteínas, entre outros. A interação resulta na alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas (modificação de pH, transferência de elétrons, variação de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons) que são detectadas e medidas pelo transdutor. O principal objetivo é produzir um sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ou frequência à concentração de um determinado analito ou grupo de analitos que interagem com o elemento biossensível. A parte eletrônica é

constituída de amplificador dos sinais elétricos e do sistema de processamento dos dados.

O desenvolvimento destes instrumentos ao longo dos anos, foi marcado pelas exigências e na natureza da aplicação destes e alguns fatores, desempenham um papel decisivo no seu projeto como sensibilidade, meio ambiente de amostra, custo, tempo de vida útil e uso específico.

Além disso, para ser usado como instrumento de análise o biossensor deve apresentar as seguintes características (SALGADO, 2001):

- ❖ **Seletividade** → o componente biológico deve discriminar diferentes substratos;
- ❖ **Sensibilidade** → a faixa de concentração do analito a ser mensurado deve ser a maior possível;
- ❖ **Acurácia e Precisão** → deve apresentar menor desvio-padrão possível;
- ❖ **Tempo de resposta** → também deve ser pequeno para justificar a implementação de biossensores, também deve ser pequeno entre uma análise e outra;
- ❖ **Frequência de amostragem** → deve ser alta, o que torna um biossensor uma ferramenta interessante no monitoramento de bioprocessos;
- ❖ **Estabilidade** → a resposta deve não variar em função de variações, como pH, solubilidade, presença de solventes, entre outros.
- ❖ **Reprodutibilidade** → é a medida da dispersão ou flutuação em uma série de medidas obtidas ao longo de um período de tempo para concentração de um

analito dentro de uma faixa de utilização. Os sistemas devem ser reprodutíveis, logo, confiáveis.

❖ **Baixo custo** → devem apresentar custo menor que outros métodos analíticos convencionais, como high performance liquid chromatography (HPLC), cromatografia gasosa (CG) e espectrometria de massa.

❖ **Portabilidade e Tamanho pequeno** → deve ser pequeno, facilitando sua instalação no ambiente de medida e transporte.

Estes sensores permitiram o desenvolvimento de uma série de técnicas eletroquímicas que oferecem rapidez e simplicidade. Permitem realizar as mais variadas tarefas como: efetuar controle em linha a nível industrial, análise ambiental em tempo real, automatização de análises bioquímicas, análise *in vivo*, detecção de substâncias biológicas relevantes (como hormônios e drogas de abuso) e detecção de agentes de guerra química.

Geralmente um biossensor permite o uso de métodos “limpos” e de baixo custo sem precisar de pré-tratamentos morosos e de grandes volumes de amostra. O seu uso, na maioria dos casos, não necessita de técnicos ou especialistas podendo em alguns casos dispensar o uso de reagentes, e aparecendo tanto como aparelhos de uso contínuo ou como descartáveis.

No desenvolvimento destes biossensores algumas etapas preliminares são de crucial importância como: a seleção do componente biológico adequado, de modo que haja um método de imobilização passível a ser aplicado a este e de modo a manter a seletividade do instrumento, e a seleção do sistema de transdução que permita converter

adequadamente o produto biológico gerado em um sinal elétrico mensurável e confiável.

Alguns biocompostos são adequados para o uso na composição, entre eles: enzimas, cofatores, receptores, anticorpos, células de microorganismos, organelas e tecidos vegetais e animais. Assim, de acordo com o elemento biológico utilizado para a sua construção, os biossensores podem ser divididos em várias classes (Figura 3). Dentre elas, as classes mais desenvolvidas são: biossensores enzimáticos, microbiológicos, os quimiorreceptores e os imunossensores.

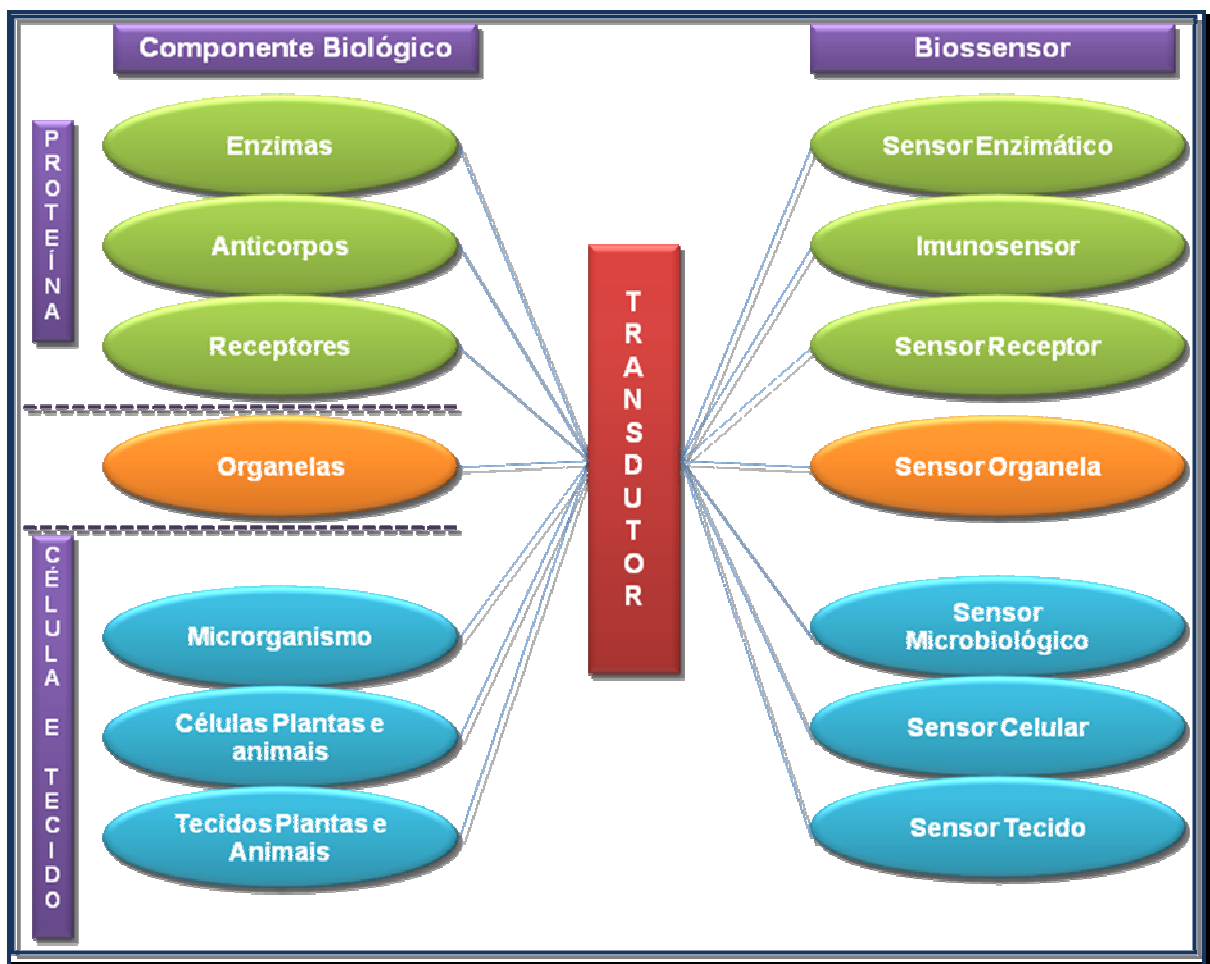


Figura 3: Classificação dos biossensores de acordo com o elemento biológico sensível (MELO, 2008).

3.6.1 Biossensores Enzimáticos

Biossensores enzimáticos, que possuem enzimas (em geral imobilizadas) como componente biológico, representam a maior parte dos biossensores já desenvolvidos (KARUBE & NOMURA, 2000). A vantagem do uso destes componentes é que as enzimas são catalisadores biológicos altamente específicos e seletivos. Comparadas aos catalisadores químicos, as enzimas apresentam um significativo alto nível de especificidade com o substrato, em função da ligação forte na molécula de substrato pelo seu sítio ativo envolvendo fatores do meio ambiente reacional tais como, tamanho da molécula de substrato, estereoquímica, polaridade, grupos funcionais ligados e relativa energia de ligação.

A maior desvantagem em relação ao uso de enzimas na construção de um biossensor é o fato de apresentarem uma estabilidade relativamente baixa, principalmente no que diz respeito à variação das condições físico-químicas do meio reacional, mas que pode ser contornada usando as condições adequadas de pH, temperatura e pressão que garantam a manutenção da atividade enzimática. Outra desvantagem é o fato das enzimas serem caras e, algumas reações enzimáticas, requererem co-fatores que se não foram facilmente regenerados, encarecem mais ainda o uso destes instrumentos (SALGADO, 2001).

Na literatura encontram-se vários trabalhos que utilizam uma ou mais enzimas como componente biológico do biossensor (SHAN *et al.*, 2007; FERRINI *et al.*, 2008; AKYLILMAZ & KOZGUS, 2009; TRIVEDI *et al.*, 2009). No trabalho realizado por Trivedi e colaboradores (2009), desenvolveram um biossensor para detectar uréia em leite, utilizando a enzima urease. Elevadas concentrações de uréia no leite significam um desequilíbrio na alimentação do gado, ou até mesmo adulteração do leite. A uréia é

um constituinte normal do leite, sendo uma boa opção para quem deseja adulterar o produto sem ser descoberto.

Num outro trabalho também recente, Akylmaz e Kozgus (2009) desenvolveram estudo baseado na estimulação enzimática. Utilizaram a enzima catalase para detectar cloreto de cálcio em amostras de leite e água. Esses compostos de cálcio podem favorecer a formação de compostos carcinogênicos. A enzima catalase é ativada na presença desses compostos de cálcio, por isso a utilizaram no desenvolvimento do biossensor.

Shan e colaboradores (2008) desenvolveram um biossensor baseado na inibição enzimática. O objetivo era desenvolver um biossensor para detectar ácido benzóico de amostras de alimentos já que este pode ser utilizado como conservantes. No entanto, o ácido benzóico quando ingerido em excesso, acumula-se e pode causar retardamento do crescimento de crianças. Os autores utilizaram o mesmo princípio selecionado para o no presente trabalho, detectar a presença e quantificar o ácido benzóico através da observação da inibição da tirosinase.

A Tabela 1 resume as características sobre as diversas classes de biossensores agrupados de acordo com o seu componente biológico.

Tabela 1: Comparação entre os componentes biológicos usados em biossensores, mostrando suas vantagens e desvantagens.

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

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

3.6.2- Métodos de Imobilização aplicados em biossensores

Nos biossensores à etapa de imobilização do material biológico na superfície do sensor constitui uma das fases cruciais no seu desenvolvimento, pois os sítios ativos da molécula devem ser preservados, a fim de não prejudicar a reação com a amostra de interesse. Diversos métodos de imobilização do material biológico podem ser testados:

oclusão (aprisionamento), microencapsulamento (confinamento em pequenas esferas), adsorção física (interações do tipo iônica, polar, ligação de hidrogênio), ligação covalente cruzada e covalente (Figura 4). Rotineiramente, têm sido usados compostos químicos como glutaraldeído (ligação covalente cruzada), cisteamina (ligação covalente), polietilenoimina (PEI), membrana de acrilamida (aprisionamento) e proteína A (presente na parede celular de cepas de *Staphylococcus aureus*), nos ensaios de imobilização de moléculas biológicas em associação ou isoladamente (FATIBELO FILHO & CAPELATO,1992).

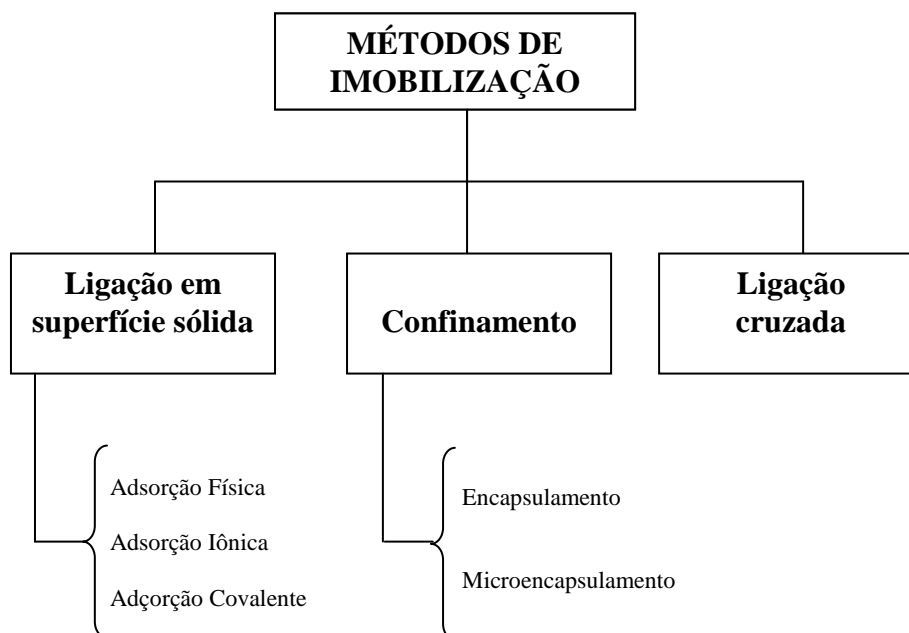


Figura 4. Exemplos Esquemáticos dos Métodos de Imobilização Enzimática.

3.5.3- Transdutores usados nos biossensores

Outro critério importante para a construção dos biossensores está relacionada à escolha do sistema de transdução, que pode ser: eletroquímico, óptico, acústico e calorimétrico, onde os mais aplicados são os eletroquímicos.

De uma forma genérica, define-se transdutor como sendo todo dispositivo que transforma uma forma de energia a outra forma de energia. No âmbito da instrumentação elétrica, define-se transdutor como sendo todo equipamento que converte qualquer grandeza física não elétrica (temperatura, som, luz, como exemplos) em um sinal elétrico. Sob o ponto de vista da confecção de um biossensor, transdutor é o equipamento que converte o produto da reação biológica em um sinal elétrico quantificável e processável. O papel deste equipamento consiste em detectar a presença, a mudança, a amplitude ou a frequência de uma grandeza submetida à medição e providenciar na saída um sinal elétrico que, quando convenientemente processado e aplicado a um aparelho de medição, seja possível quantificar o elemento medido (PATEL, 2002).

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

3.6.3. Biossensores Eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos podem ser divididos em: amperométricos, potenciométricos e condutimétricos. Essa classe se caracteriza por serem: simples,

sensíveis, confiáveis e de resposta rápida; necessitem de instrumentação de baixo custo; operem em condições em que não é necessário um pré-tratamento da amostra e permitirem efetuar determinações em uma ampla faixa de concentração (STANCA & POPESCU, 2004).

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

O princípio de funcionamento dos biossensores amperométricos é caracterizado pela a medida da corrente produzida por uma reação química entre espécies eletroativas. Esta reação ocorre num potencial determinado (que pode ser gerado internamente, eletrodo galvânico ou externamente, eletrodo polarográfico) e a corrente gerada está relacionada com a espécie em solução. Assim estes biossensores dependem tipicamente de um sistema biológico que converta cataliticamente analitos inativos eletroquimicamente em produtos que possam ser oxidados ou reduzidos em um eletrodo operante, o qual é mantido em um potencial específico de acordo com um eletrodo de

referência. A corrente produzida pela reação redox é linearmente proporcional à concentração do produto eletroativo, a qual é proporcional ao analito (substrato da enzima) não eletroativo (D'ORAZIO, 2003).

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

A construção de eletrodos quimicamente modificados através do desenvolvimento de técnicas de imobilização tanto das enzimas como dos mediadores fez surgir uma nova classe de transdutores amperométricos. Os mediadores podem ser incorporados aos eletrodos por adsorção, oclusão em filmes poliméricos, ligação covalente ou simplesmente misturados em pasta de carbono (ROMANI *et al.*, 2000). Pandey e colaboradores em 1993 (*apud* FERNANDES, 2005) desenvolveram um biossensor para medição da glicose, onde a enzima glicose oxidase estava incorporada a uma pasta de grafite e epóxi modificada e material eletroativo (mediador) tetracianoquinodimetano (TCNQ). A mistura pastosa obtida era usada para preencher o corpo de um eletrodo ligante. Esta tecnologia é conhecida como *screen printing*.

Este tipo de biossensor representa a maioria dos dispositivos comerciais disponíveis atualmente, isto porque estes eletrodos são baseados em enzimas redox (oxiredutases) (SIGNORI & FATIBELLO-FILHO, 1994) e existem um grande número

destas enzimas comercialmente disponíveis que podem atuar em ácidos graxos, açúcares, aminoácidos, aldeídos e fenóis.

A Tabela 2 apresenta alguns biossensores amperométricos para a análise de compostos fenólicos.

Tabela 2: Biossensores amperométricos para análise de compostos fenólicos a base de tecidos e célula.

| Tecido/Célula | Enzima(s) | Analito | E vs Ag/AgCl (ph) |
|----------------------|-------------------|---|--------------------------|
| Cogumelo | Tirosinase | Fenol (0,16-15 ppm) | -0,2 V (7,5) |
| Banana | Polifenol Oxidase | Dopamina (5-90 µM). Catecol, L-Dopa, Epinefrina, Hidroquinona | -0,2 V (7,4) |
| Cogumelo | Tirosinase | Fenol, p-cresol, p-clorofenol | -0,2 V (5,0) |
| Berinjela | Polifenol Oxidase | Dopamina (50-250 µM) L-dopa (100-600 µM) Catecol (5-45 µM) | 0,2 V -(7,0) |
| Espinafre | Catecol Oxidase | Dopamina (2-160 µM) L-dopa, neropinefrina | -0,2 V (8) |
| Espinafre | Polifenol Oxidase | Dopamina (50mM) | -0,2 V (7,4) |

Fonte: ROSATTO, 2000.

A amperometria é a técnica eletroquímica geralmente aplicada em biossensores disponíveis comercialmente e estes utilizam normalmente como elemento transdutor um eletrodo de oxigênio.

O primeiro biossensor foi desenvolvido pelo professor Clark em 1962, e este sensor consistiu de um biossensor enzimático para glicose (eletrodo de Clark) composto de um sistema de dois eletrodos amperométricos (eletrodo de O₂) separados da solução da amostra por uma membrana permeável a gás. Atualmente, existem sensores amperométricos baseados no sensor de oxigênio tipo Clark para determinação de oxigênio em uma variedade de ambientes líquidos (PORRAS, 1996).

O eletrodo de oxigênio consiste de um catodo e de um anodo condutivamente conectados por um eletrólito. Uma tensão adequada de polarização entre o catodo e o anodo reduz o oxigênio no catodo. A tensão é selecionada de modo que o oxigênio seja completamente reduzido, sendo que os demais gases não são afetados. A tensão ideal para o sistema Pt/Ag/AgCl encontra-se entre -500 e -750mV . Abaixo são representadas as equações químicas (Equações 1 e 2) das reações que ocorrem na superfície do eletrodo.



Tais reações resultam na produção de uma corrente elétrica que é proporcional à pressão parcial de oxigênio no meio ($p\text{O}_2$). O eletrodo de oxigênio consome o oxigênio que é continuamente extraído da solução (oxigênio dissolvido) sendo a vazão e a viscosidade da solução parâmetros importantes na determinação.

O oxigênio se difunde através da membrana e é reduzido em um eletrodo de platina catodicamente contra um eletrodo de referência (Ag/AgCl). Um eletrodo de trabalho (platina) é separado de um eletrodo de referência (Ag/AgCl) por um material isolante e, ambos, imersos numa solução concentrada de KCl. Uma diferença de potencial (ddp) constante é mantida entre os dois eletrodos por meio de polarização catódica do eletrodo de trabalho. A solução, o catodo e o anodo são separados do meio que contém o analito por uma membrana permeável ao oxigênio (FERNANDES, 2005 a). A Figura 5 mostra um eletrodo de oxigênio comercial.



Foto tirada por: Bótelho, A.C.N.

Figura 5. Eletrodo de oxigênio dissolvido comercial.

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

A taxa com a qual os elétrons saem do eletrodo é proporcional à concentração de O_2 disponível para capturá-los. A corrente flui do eletrodo de Ag para o eletrodo de Pt quando os elétrons saem deste para a solução. A retirada de elétrons do eletrodo de prata produz íons de prata os quais estão em baixa concentração se comparados com os íons cloreto, na solução. Esses íons de prata se combinam com os de cloreto, formando um acúmulo de cloreto de prata na superfície do eletrodo de prata, deixando íons de potássio para trás, porém, como íons de hidrogênio são retirados da solução pelo consumo de oxigênio, o sistema é eletrostaticamente neutro (FERNANDES, 2005b).

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

Na literatura, existem diversos trabalhos que descrevem o desenvolvimento de biossensores que utilizam o eletrodo de oxigênio como transdutor para a detecção e monitoração de diversos analitos, como: glicose, compostos fenólicos (TIMUR *et al.*, 2004), etanol (AKYILMAZ & DINCKAYA, 2000; HUANG & WU, 2006) e cálcio (SHAN *et al.*, 2008) entre outros.

3.7. Aplicação dos Biossensores

As vantagens dos biossensores em relação às técnicas convencionais não se limitam à sensibilidade e seletividade, mas ao fato de, geralmente, dispensarem um elaborado pré-tratamento da amostra (praticidade), rapidez nas análises e gastos mínimos de reagentes, proporcionando assim, agilidade na obtenção dos resultados, redução no custo financeiro e redução dos resíduos gerados por análise. Por estes motivos estes instrumentos têm atraído o interesse de diferentes áreas como: saúde, diagnose clínica, militar, controle de processos, pecuária, agricultura, monitoramento ambiental e indústrias de alimentos e bebidas. Dentre estas, a área que mais vem se desenvolvendo na sua criação e comercialização é a área médica (saúde) e de diagnose clínica.

Na área da saúde, o mais conhecido é o biossensor eletroquímico, para acompanhamento do nível de glicose no sangue, principalmente por diabéticos. O aparelho pode ser adquirido, facilmente, em farmácias com a opção de diferentes

marcas. Biossensores comerciais para o monitoramento de lactose, uréia, creatinina e colesterol encontram-se em fase de desenvolvimento (BOGUE, 2005).

Na área médica é de extrema importância a determinação de gases, íons ou metabólitos, como glicose no sangue, pois os pacientes que requerem uma terapia intensiva freqüentemente mostram rápidas variações nos níveis bioquímicos destes componentes, e isto, muitas vezes, requer uma ação urgente e apropriada. A aplicação dos biossensores permitiu que este monitoramento fosse realizado de forma efetiva, rápida e segura garantindo um tratamento imediato do paciente em condições críticas, como no caso dos pacientes diabéticos, onde o sensor miniaturizado é implantado como parte da regulação do equipamento de infusão de insulina (BOGUE, 2005).

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

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

Na área militar, os estudos sobre estes instrumentos são mantidos em sigilo e envolvem a detecção de gases tóxicos, explosivos, agentes patogênicos e toxinas, onde os requisitos exigidos para um biossensor que atue nesta área são: durabilidade frente às intempéries, facilidade de operação e operação contínua e remota com alta confiabilidade e sensibilidade (SALGADO, 2001).

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

Na pecuária, biossensores também têm sido recomendados para detecção de drogas veterinárias residuais. O uso de hormônios esteróides em animais destinados ao abate foi proibido, subseqüentemente, rigorosos procedimentos têm sido implementados para detectar a administração ilegal desses componentes, principalmente, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa. Contudo, alguns trabalhos na literatura apontam que a detecção e o monitoramento de componentes anabólicos por cromatografia gasosa não são totalmente seguros.

Imunoensaios e biossensores têm sido desenvolvidos para analisar a presença de hormônios e antibióticos através de secreções e urina de animais com resultados bastante satisfatórios (GILLIS *et al.*, 2002; HABAUZIT, *et al.*, 2007).

No monitoramento de pesticidas, no meio ambiente e em diversos alimentos, trabalhos envolvendo biossensores empregam a acetilcolinesterase e monitoram a ocorrência de inibição da enzima por organofosforados e carbamatos, pois tais substâncias ligam-se ao centro ativo da enzima, impedindo a reação de hidrólise da acetilcolina em colina e acetato.

Na agricultura, biossensores podem também detectar e quantificar patógenos de plantas no campo, e definir posições com o auxílio de sistema de posicionamento global (GPS), que podem orientar o produtor a realizar aplicações de pesticidas pontuais, reduzindo e otimizando o uso de agroquímicos. Podem ser utilizados em diferentes etapas da cadeia de produção de alimentos agrícolas, desde a detecção do patógeno no campo até o período de armazenamento de lotes de sementes (sob o risco de serem contaminados com fungos produtores de toxinas). Em vista desse potencial, estes sensores biológicos aplicados à agricultura têm sido estudados desde 1992 (SCOTTRUPP *et al.*, 2008).

Bactérias e patógenos virais responsáveis por doenças na agricultura podem ser detectados por diferentes tipos de biossensores, entre eles os que empregam como molécula biológica ativa seqüências de DNA. Seqüências de DNA, que são complementares às porções únicas do DNA bacteriano ou viral, devem ser identificadas e imobilizadas na superfície do sensor. O reconhecimento é dependente da formação de ligações de hidrogênio estáveis entre as fitas de ácido nucléico. Esse tipo de sensor apresenta como desvantagem o pré-tratamento da amostra, que deve passar por processos de extração de DNA, e desnaturação das fitas de ácido nucléico para,

posteriormente, serem submetidas à hibridização com a molécula imobilizada na superfície do sensor (IVNITSKI *et al.*, 2000). Esse mesmo princípio pode ser adotado para a detecção de plantas geneticamente modificadas, em que o gene de interesse pode ser imobilizado na superfície do sistema transdutor do sistema.

Na área ambiental, a aplicação dos biossensores é interessante, visto que eles apresentam características importantes quando se deseja fazer um monitoramento ambiental, como: portabilidade, custo baixo (tanto por sistema, como por análise), preparação mínima de amostra e estabilidade do instrumento frente aos inúmeros obstáculos existentes neste campo (amplo número de potenciais poluentes, suas várias classes químicas e altas concentrações). São usados na monitoração e controle do ambiente, principalmente na detecção de metais pesados em amostras de solo e herbicidas e pesticidas em amostras de água de rios e lagoas (VELASCO-GARCIA & MOTTRAM, 2003).

A falta de credibilidade destes instrumentos para a aplicação em algumas áreas é ainda um grande problema que contribui para a escassez deste no mercado. Uma das soluções para este problema tem sido o desenvolvimento de sensores multienzimáticos que permitam a determinação simultânea de compostos de interesse presentes em uma mesma amostra, diminuindo custos, visto que é necessário o uso de um único instrumento e ainda possibilitam, em alguns casos, que possíveis compostos interferentes sejam eliminados (BOGUE, 2005).

3.8. Biossensores na área de alimentos

Nas indústrias de alimentos e bebidas, os biossensores também encontram um campo potencial de aplicação especialmente como detectores analíticos de carboidratos

(glicose, sacarose, frutose, lactose e galactose), amido, álcool (etanol e metanol), uréia, aminoácidos, composição de vitaminas e análise de corantes, estabilizantes e emulsificantes (MELLO & KUBOTA, 2002). A atual detecção da maioria destes compostos é realizada industrialmente utilizando métodos cromatográficos, por medida da atividade ótica, por medida do índice de refração ou por métodos analíticos padrões através de reações químicas, que requerem pré-tratamento da amostra e são muito sensíveis à presença de compostos interferentes.

Também nas análises de qualidade de alimentos, os biossensores são aplicados, sobretudo, na detecção de contaminantes químicos e biológicos, no entanto, eles podem ser utilizados conforme descrito adiante. Considerando a questão de segurança microbiológica, o uso destes sensores reduz a manipulação da amostra e, conseqüentemente, diminui também as possibilidades de contaminação humana, fazendo com que os biossensores sejam recomendados para laboratórios de microbiologia de alimentos (IVNITSKI *et al.*, 2000).

A detecção de microrganismos pelos biossensores pode ser realizada por duas formas, direta ou indiretamente. A primeira é baseada na interação direta da molécula bioativa com o microrganismo, sendo esse um tipo de biossensor que tem sido bastante empregado na detecção de bactérias patogênicas. Este sistema emprega uma microbalança de cristal de quartzo (transdutor piezoelétrico), sendo que em alguns casos sua aplicabilidade para análise de alimentos encontra dificuldades práticas em função da elevada sensibilidade deste sistema de transdução. A detecção indireta é baseada no monitoramento de metabólitos microbianos por meio de reações bioquímicas, que ocorrem na superfície do transdutor. Alguns parâmetros, tais como, mudança no pH, consumo de oxigênio, concentração de íons, diferença de potencial, corrente ou resistência podem ser medidos por transdutores eletroquímicos. O transdutor pode

detectar o consumo de oxigênio e, o aparecimento ou a degradação de um metabólito ativo eletroquímico.

Biossensores eletroquímicos baseados em eletrodo de oxigênio e CO₂ têm sido utilizados para determinação de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* sp. (IVNITSKI *et al.*, 2000).

Toxinas produzidas por microrganismos também são passíveis de detecção pelos diferentes tipos de biossensores, principalmente, os amperométricos, os quais têm sido indicados como alternativa para substituição de “kits” comerciais, em sua maioria, importados e de alto custo (IVNITSKI *et al.*, 2000).

Esses “kits”, geralmente, se baseiam na interação antígeno-anticorpo, apresentam detecção limitada quanto aos diferentes subgrupos de uma determinada toxina. Os imunossensores, um tipo de biossensor baseado na interação antígeno/anticorpo, empregam duas técnicas sensíveis e específicas na detecção de contaminantes biológicos, técnicas eletroquímicas e imunológicas, que têm demonstrado vantagens na detecção e no menor custo das análises em relação aos kits comerciais. Outra aplicação dos biossensores é na determinação de vitaminas em bebidas, produtos farmacêuticos e alimentos com potencial para serem aplicados na indústria. No caso do ácido ascórbico, a enzima ascorbato oxidase tem sido imobilizada em superfícies diversas e utilizada para catalisar a oxidação de L- ácido ascórbico na presença de oxigênio, como a seguir: $2 \text{ L-ascorbato} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{ dehidro-L-ascorbato} + 2\text{H}_2\text{O}$. A concentração do ácido ascórbico tem sido diretamente relacionada com o consumo de oxigênio (TOMITA *et al.*, 2005).

Estes instrumentos podem ser utilizados ainda na análise de uma ou mais substâncias químicas e biológicas, presentes em uma mesma amostra, ou na detecção de um determinado analito em várias amostras simultaneamente (DENG & DONG, 2007).

Esta característica é de suma importância para a indústria de alimentos, pois muitas vezes é necessário analisar vários constituintes em uma mesma amostra de alimento, o que consome tempo e torna o processo mais laborioso e custoso.

Os biossensores que detectam mais de um tipo de substância, ou microrganismo em uma única amostra, são conhecidos como biossensores multicanais, sendo os vários canais passíveis de serem combinados em um *chip*, aumentando a utilidade do biossensor. O desenvolvimento de biossensor multicanal para avaliar, rapidamente, e especificadamente, a qualidade e determinação do estado fisiológico de frutas podem ser encontrados na literatura. O amadurecimento de frutas, normalmente, está associado com uma seqüência de mudanças bioquímicas envolvidas na cor, sabor e textura. Alterações em sabor incluem mudanças em acidez, adstringência e doçura que, por sua vez, são dependentes dos ácidos orgânicos, açúcares e voláteis presentes nos tecidos. Nesse sentido, o biossensor multicanal para D-glicose, frutose, sacarose, ácido cítrico, ácido málico e ascórbico pode ser desenvolvido para acompanhar processo de amadurecimento de frutas baseado, por exemplo, em enzimas oxidases, com a geração de peróxido de hidrogênio como produto final (JAWAHEER *et al.*, 2003).

Outras aplicações dos biossensores para análise da qualidade de alimentos e sistemas disponíveis no mercado, encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Biossensores disponíveis ou em desenvolvimento por empresas para análise da qualidade de alimentos.

| Biossensor | Empresa |
|--|---|
| Acompanhamento de deterioração de peixe | Oriental electric |
| Detecção de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 em alface (Canary) | Massachusetts Institute of Technology |
| Detecção de <i>E. coli</i> O157:H7 e <i>Salmonella</i> em produtos cárneos | Michigan State University's Electrochemical Biosensor |
| Detecção de <i>Salmonella</i> e <i>Campilobacter</i> em indústrias de suíno | Georgia Research Tech Institute |
| Detecção de enterotoxina estafilocócica B e toxina botulínica A em tomate, milho doce, grãos e cogumelos | Naval Research Laboratory |
| Detecção de traços de atrazina | Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), em cooperação com CSIC |

Fonte: Meatprocess.com (2008); Medical News Today (2008).

Neste trabalho nos ensaios preliminares para a construção de um biossensor para a área de alimentos, com objetivo de avaliar a qualidade de leite, observou-se a queda no consumo de oxigênio dissolvido no meio (com uso de um eletrodo de oxigênio) devido à inibição da reação enzimática da tirosinase (usada como componente biológico) pelo ácido benzóico, que é um dos produtos da ação da enzima hipuricase quando hipurato de sódio é adicionado a amostra, sendo esta enzima produzida quando *Streptococcus agalactiae* está presente no leite. Este microorganismo se apresenta no leite quando a vaca apresenta mastite. Um resumo da proposta desse trabalho é demonstrado no esquema da Figura 6 a seguir.

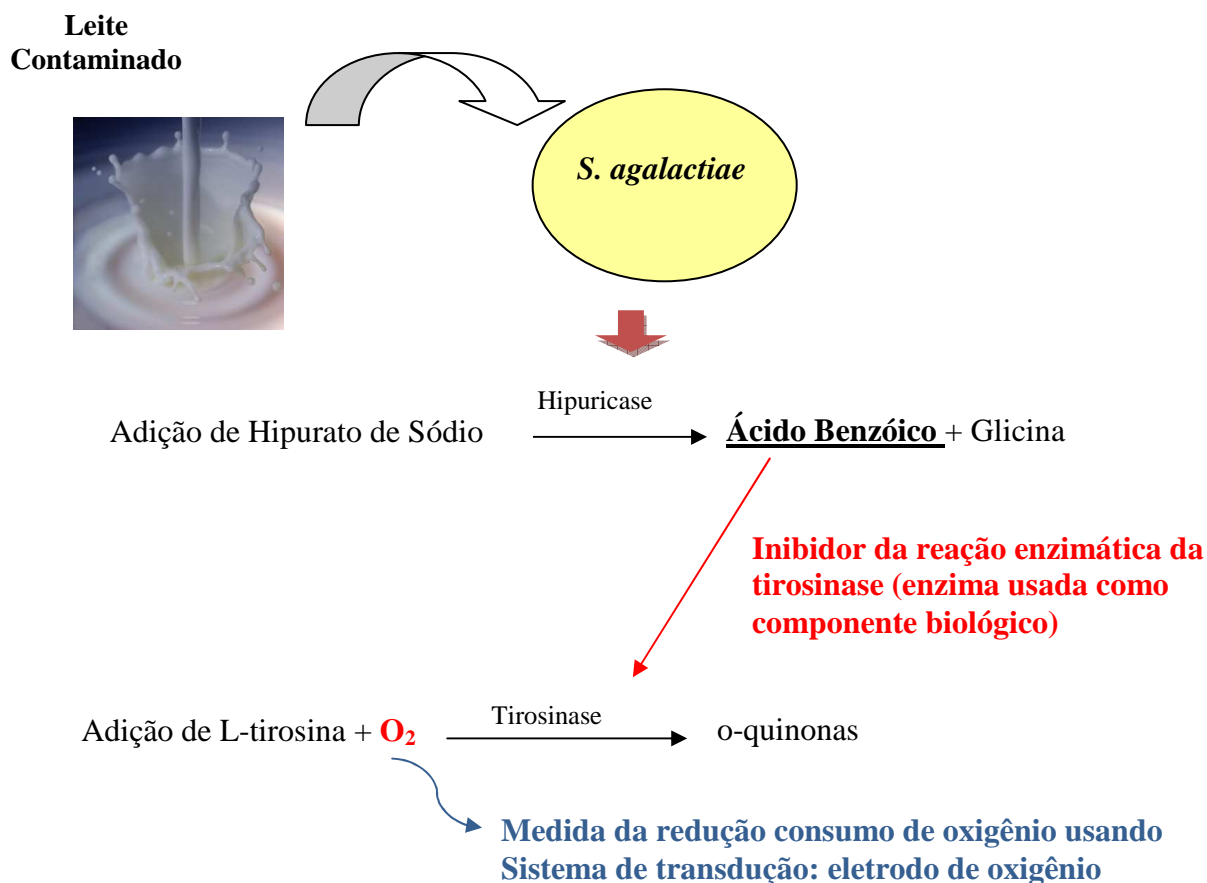


Figura 6. Esquema resumido da proposta do presente trabalho.

O desenvolvimento de biossensores ganha cada vez mais espaço na literatura e no financiamento de empresas interessadas no lançamento dessa tecnologia no mercado. Nos Estados Unidos, onde há grande investimento em pesquisa na área de nanotecnologia, o mercado potencial estimado é de cerca de 11 bilhões de dólares com crescimento de 10,8% nos últimos anos (BOGUE, 2005). À medida em que novos equipamentos são lançados no mercado, maiores são os investimentos e avanços em pesquisa nesta tecnologia. A tendência é a combinação da nanotecnologia com estes instrumentos por meio da miniaturização da área da superfície de materiais e do uso de nanopartículas para desenvolver sistemas mais sensíveis, com tempo de resposta mais rápido.

CAPÍTULO 4: MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Equipamentos

Durante o presente trabalho, foram utilizados os seguintes equipamentos: estufa de secagem (Quimis); placa de aquecimento e agitação (Quimis); agitador orbital (Tecnal TE-420); espectrofotômetro (Hach DR/4000UV); bomba a vácuo (Motores Elétricos Brasil S.A); medidor de pH (Chemcadet); centrífuga (Excelsa 2); bomba de aquário (Aqualife 200); eletrodo de oxigênio dissolvido série Digmed (DG-010).

4.2. Biocomponente: Enzima tirosinase obtida de tecido fúngico

O tecido fúngico utilizado para extração da enzima tirosinase foi *Agaricus bisporus*, conhecido vulgarmente como cogumelo Paris ou champignon. *Agaricus bisporus* é uma fonte rica em tirosinase e por isso foi escolhido como fonte da enzima tirosinase (SILVA, 2009). Os lotes de cogumelos utilizados neste trabalho foram adquiridos no mercado popular situado na cidade do Rio de Janeiro (RJ): Centro de Abastecimento do Estado da Guanabara (CADEG). Eles foram comprados sempre em um mesmo revendedor, evitando, assim, maiores variações entre os mesmos. Todos os lotes adquiridos apresentaram aparência similar (coloração branca, poucas vezes com um tom amarronzado). Os cogumelos foram utilizados para a extração da enzima tirosinase após, no máximo, 3 dias de sua compra. Até a sua utilização, foram conservados sob refrigeração a 4°C.

4.3. Métodos Analíticos

4.3.1. Procedimento de extração da tirosinase

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

4.3.2. Procedimento de dosagem da atividade enzimática dos extratos

A atividade tirosinásica dos extratos enzimáticos obtidos foi determinada de acordo com procedimento descrito por Campos *et al.* (1996). O procedimento consistiu em adicionar em um bécher 5,5 mL de solução 0,2M de tampão fosfato de sódio a pH 6,0, 1,5 mL de solução 0,2M de L-tirosina (SIGMA), e 1mL do extrato enzimático previamente diluído em uma razão de 1:10 no mesmo tampão. A mistura reacional foi levada para análise em espectrofotômetro, onde a variação de absorvância proveniente da reação enzimática foi lida em $\lambda=280$ nm em intervalos de 30 segundos durante 999 segundos.

A unidade de atividade enzimática da tirosinase foi definida como sendo a quantidade de enzima que promove o incremento de 0,001 na absorvância a 280 nm por minuto. A atividade foi calculada segundo a seguinte fórmula apresentada na equação 1:

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

Equação 1

Onde: Abs₁ e Abs₂ são as leituras de absorvâncias nos tempos t₁ (tempo inicial) e t₂ (tempo final de reação), em sua fase de aumento linear; V_E é o volume da solução enzimática (1 mL) e D_E é o fator de diluição aplicado a solução enzimática.

4.3.3. Determinação da atividade tirosinásica no leite

Inicialmente, observou-se a necessidade de verificar se a enzima tirosinase exibiria atividade na amostra a ser utilizada (leite), já que o objetivo do sistema proposto é baseado na observação da inibição enzimática nestas amostras. Assim foi necessário observar se o leite, naturalmente por si só, não causaria alguma inibição na atividade da enzima.

Neste teste foi realizada a determinação da atividade enzimática da tirosinase obtida de tecido de cogumelo (100U/mL – concentração escolhida para testes iniciais). Como substrato para a enzima foi usada a L-tirosina (0,2M) preparada em solução tampão pH 6,00, ambas adicionadas nas amostras de leite. Ambas as soluções: amostra ((leite), substrato (L-tirosina)) e solução enzimática (tirosinase) foram usadas em temperatura ambiente (23 ± 2°C). O leite utilizado para todos os testes foi da mesma marca e do tipo integral. E em função de ser um produto perecível diversos lotes foram utilizados ao longo dos testes da mesma marca. Os testes foram realizados em bécheres

de 10 mL, para garantir um mínimo de área livre passível de troca de oxigênio, e durante os mesmos os sistemas foram vedados com filme plástico para manter o controle da concentração de oxigênio do meio. A determinação da redução da concentração de oxigênio dissolvido no meio, em função da reação enzimática, foi realizada com o auxílio de um eletrodo de oxigênio dissolvido.

Antes de proceder à reação, foi necessária uma etapa de saturação das soluções com oxigênio (amostras de leite e solução de L-tirosina). A saturação das soluções visou minimizar as variações iniciais da concentração de oxigênio dissolvido destas, e assim garantir que a variação da concentração de O₂ lida, ocorresse somente em função da reação enzimática. Essa etapa de saturação foi realizada antes de cada teste, sendo executada com o auxílio de uma bomba de aquário, que borbilhava ar na amostra por um período de 5 minutos (SILVA, 2008).

Em todos os testes posteriores esta metodologia de determinação da atividade enzimática foi seguida com pequenas variações, em relação às soluções reacionais usadas e outros parâmetros, sendo todos os testes realizados em triplicata.

4.3.4. Determinação da melhor diluição da amostra - Leite

Levando-se em consideração que o leite é um mistura heterogênea com muitas gorduras e outras substâncias, optou-se por determinar a menor e melhor concentração do mesmo, para a realização dos testes, de modo que houvesse um mínimo de prejuízo ao eletrodo de oxigênio.

Este teste foi fundamental para garantir a segurança das medições, e permitir que o sistema de transdução (eletrodo de oxigênio) retornasse depois de cada medida, após lavagem do mesmo, com a leitura de seu sinal inicial (sinal estabilizado obtido antes da

reação). Os componentes do leite quando presentes na sua concentração natural, com o tempo tendem a aderir a membrana do eletrodo, variando o sinal de leitura do mesmo e conseqüentemente acarretando possíveis erros de mediação.

As amostras de leite foram diluídas em proporções de 1:2 e 1:10 utilizando solução 0,2M de tampão fosfato de sódio pH 6,0. O pH do leite foi ajustado sempre que necessário para valores entre 6 e 7, valores ideais para a reação da enzima tirosinase. O ajuste do pH foi feito com solução de NaOH 0,1N ou HCl 0,1N.

Para determinar qual a melhor diluição foi realizado o mesmo procedimento de determinação da atividade da enzima tirosinase descrita no item 4.3.3.

4.3.5. Determinação do tempo de estabilização do eletrodo

Devido à necessidade de saturar as amostras com oxigênio, foi necessária a inclusão de uma etapa de determinação da estabilização da leitura do sinal fornecido pelo eletrodo quando imersos na solução saturada. Este teste contribuiu para determinar se o tempo usado para saturação das soluções, 5 minutos, foi suficiente para garantir que a mesma fosse atingida. Foram realizadas leituras do sinal do eletrodo nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 minutos. Nesta etapa o procedimento de item 4.3.3 foi realizado, no entanto o biocomponente (enzima) não foi adicionado. O tempo de estabilização foi selecionado como o menor tempo onde foi observada a menor variação na leitura da concentração de oxigênio dissolvido no meio obtida através da leitura do sinal do eletrodo.

4.3.6. Determinação da melhor concentração de substrato (L-tirosina)

Para detectar a inibição enzimática da tirosinase, é preciso que o sistema esteja submetido as suas condições ótimas. Desta forma, poderá se garantir que a inibição de

fato ocorreu pela presença do ácido benzóico e não por qualquer outro fator intrínscico que pudesse afetar a atividade enzimática.

Além da temperatura e do pH, outro fator que acarreta inibição da atividade enzimática é a concentração de substrato. Desta forma testes foram realizados visando determinar a melhor faixa de concentração de substrato (L-tirosina) a ser usada para uma concentração fixa de enzima a ser adicionada. Foram testadas diferentes concentrações de L-tirosina: 36,23 (0,2M); 72,48 (0,4M); 108,71 (0,6M); 144,95 (0,8M); 181,19 (1,0M) g/L e uma concentração de 100 U/mL de enzima. O teste foi realizado como descrito no item 4.3.3, sendo o tempo de estabilização da leitura do eletrodo após saturação das soluções de leite, antes de colocar enzima e substrato, de 3 minutos, determinado no item 4.3.5.

4.3.7. Determinação da melhor concentração de enzima (tirosinase)

Outro fator que também pode influenciar principalmente na sensibilidade do método aplicado, é a concentração enzimática usada. O ideal é utilizar concentrações enzimáticas que garantam robustez e segurança na determinação, mantendo as características que os testes devem ter (para o caso do futuro biossensor a ser desenvolvido), pequenos volumes aplicados e economicidade.

Foram testadas concentrações enzimáticas de tirosinase de 200U/mL e 400U/mL. Neste teste a concentração de substrato usada foi a obtida como a melhor, a partir dos resultados alcançados com o procedimento descrito no item 4.3.6. Também neste teste foi seguido o procedimento de determinação da atividade enzimática descrita no item 4.3.3, variando apenas a concentração da enzima usada.

4.3.8. Determinação do melhor tempo de resposta

Outro fator importante é a determinação do melhor tempo de resposta do sistema. Este tempo é caracterizado como, o menor tempo em que já é possível observar a variação do sinal do eletrodo em função da reação enzimática, seguindo a metodologia proposta no item 4.3.3.

Esta determinação é fundamental, já que o objetivo deste trabalho é de propor um novo método, que possa ser usado na construção de um instrumento biossensor, visando substituir o método comercial padrão para o diagnóstico de *S. agalactiae* em leite que consiste da cultura do material clínico (leite) em meio seletivo por período de 36 horas. Assim, obter um método que possa ser realizado em um tempo menor, seria extremamente vantajoso.

Foram testados tempos de 1 até 17 minutos de reação após a adição do substrato e da solução da enzima às amostras de leite saturadas após estabilizar a leitura do eletrodo. Os testes foram realizados em triplicata e para cada teste foram obtidos os valores de leitura do eletrodo de oxigênio dissolvido a cada um minuto de reação.

4.3.9. Determinação do intervalo de concentrações de ácido benzóico

Como foi dito anteriormente, o ácido benzóico (produto da reação da hipuricase, enzima produzida por *S. agalactiae*) tem a característica de inibir a atividade da enzima tirosinase, e será baseado nesta propriedade que será desenvolvido futuramente o sistema biossensor.

Dependendo da quantidade de microrganismos *S. agalactiae* presentes nas amostras de leite contaminadas, concentrações diferentes de ácido benzóico serão

produzidas pela enzima hipuricase (presente nestes microrganismos), quando hipurato de sódio for adicionado as amostras. Quanto maior o número de células contaminantes, maior a concentração enzimática, e portanto, maior a concentração de ácido benzóico produzida. Este teste foi fundamental, pois não existe na literatura nenhum dado que demonstre estequiometricamente qual a quantidade de enzima produzida pelo microrganismo na presença do substrato (hipurato de sódio), e portanto, não se tem noção do quanto de ácido benzóico seria necessário para inibi-lá quando esta é produzida por *S. agalactiae*.

Assim, a questão importante esta relacionada à concentração de ácido benzóico necessária para de fato inibir a ação da enzima tirosinase, de modo que, o sistema de transdução escolhido (eletrodo de oxigênio) seja capaz de detectar a redução da variação (redução da diminuição) da concentração de oxigênio em função da menor atividade enzimática.

O ácido benzóico comercial utilizado é fracamente solúvel em água, por isso as soluções foram preparadas em acetona P.A. (VETEC). O uso deste solvente não interferiu nos testes, pois é o mesmo utilizado para extrair a enzima do cogumelo não sendo danosa à enzima. Foram preparadas soluções de ácido benzóico nas concentrações de 0,1221; 1,2212; 24,424; 48,848; 73,272; 97,696; 122,12 g/L. Seguindo o procedimento descrito no item 4.3.3, a solução enzimática e o substrato foram adicionados nas concentrações ótimas determinadas nos testes anteriores, e logo em seguida foi adicionada à solução de ácido benzóico nas concentrações citadas, a fim de se observar a inibição proporcionada pelo composto fenólico. O volume de solução adicionado garantiu que a solução final estava nas concentrações descritas acima. Outro teste feito a fim de se observar o tipo de inibição enzimática, competitiva ou não

competitiva. Esse teste foi como o anterior, apenas como diferença colocando-se o ácido benzóico após 7 minutos de reação enzimática ter se iniciado.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração e determinação da atividade enzimática da tirosinase

Neste trabalho, a fonte de enzima tirosinase foi o cogumelo (*Agaricus bisporus*) e sua extração seguiu o protocolo desenvolvido por Kameda (2003). Além do sobrenadante inicial, primeiro extrato enzimático, foram realizadas etapas de extração da enzima ainda contida na pasta obtida, o segundo e terceiro extrato enzimático, respectivamente. Somente três lotes de cogumelos foram utilizados, sendo estes suficientes para execução do trabalho. Cabe ressaltar que o objetivo não era extrair uma grande quantidade de enzima, mas sim apenas obtê-la para execução dos testes. Os resultados das atividades enzimáticas em U.mL^{-1} dos lotes de cogumelos são apresentados na Figura 7. Os valores de atividade enzimática dos lotes utilizados no trabalho variaram de aproximadamente 50U.mL^{-1} a 400U.mL^{-1} . Os resultados apresentados não mostram os dados de todos os extratos obtidos, já que alguns foram descartados, visto que não apresentaram uma atividade coerente. Portanto, optou-se por mostrar apenas os dados dos extratos efetivamente utilizados no trabalho. As melhores atividades foram encontradas nos segundos extratos enzimáticos obtidos de cada lote, fato esse corroborado por Kameda (2003) e Silva (2009).

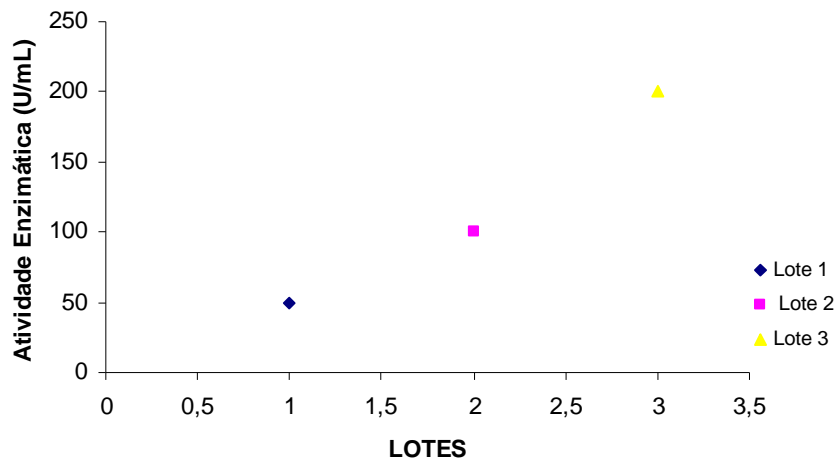


Figura 7. Atividade enzimática ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) dos lotes de cogumelos usados no trabalho.

Analisando-se os valores obtidos da atividade enzimática, pode-se observar que não foi um valor de atividade importante, já que outros trabalhos apresentaram valores bem maiores que os encontrados neste trabalho, como $2400\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ (PAPA *et al.*, 1994; BEVILAQUA *et al.*, 2000; KAMEDA, 2003; SILVA; 2009). No entanto, não houve um efeito negativo sobre o trabalho, pois os volumes eram ajustados para se obter à concentração de interesse. Esses valores baixos podem ser explicados com o uso de lotes de cogumelos muito novos, já que Bevilaqua (2000) mostrou que a variação presente nos extratos enzimáticos ocorreu quando se comparou cogumelos envelhecidos com o lote controle, onde se observou um aumento de 48% na atividade enzimática do primeiro em relação ao segundo. Ingebrigtsen *et al.* (1989) relataram que um fator que influencia a atividade da tirosinase no extrato é portanto o grau de maturação dos cogumelos. Assim, provavelmente, apesar da aparência similar, os cogumelos deveriam estar em graus de maturação distintos. Vale a pena ressaltar que o uso de uma enzima naturalmente extraída de um tecido torna o projeto do futuro biosensor menos oneroso,

do que se usada uma enzima comercial, daí a importância de se continuar o trabalho aplicando esta enzima obtida experimentalmente.

5.2. Determinação da atividade tirosinásica no leite

O leite é uma mistura heterogênea e, portanto, poderiam haver substâncias que inibissem ou mesmo impedissem a atividade da tirosinase quando esta fosse adicionada ao leite. O leite não diluído foi saturado de oxigênio por 5 minutos (SILVA, 2008) e posteriormente submetido a reação enzimática. Os resultados foram obtidos com o auxílio do eletrodo de oxigênio, o instrumento de transdução utilizado nesse trabalho, que fornecia a concentração de oxigênio já em mg/L a partir de uma curva de correlação contida no sistema que relaciona sinal elétrico (Amperes) à concentração de oxigênio dissolvido presente no meio (mg/L). Na Figura 9, está demonstrada a atividade enzimática no leite, com a observação da queda da concentração de oxigênio dissolvido no meio, comprovando que a composição do leite não afetou a atividade da enzima. Como foi dito anteriormente, a tirosinase é uma enzima oxidativa, portanto, utiliza oxigênio durante sua catálise. Assim, os resultados obtidos nesta etapa foram fundamentais para a continuidade do trabalho, já que com isso poderia ser garantido que caso houvesse inibição da atividade da enzima seria em função da presença de *S. agalactiae* e não pela presença de qualquer outra substância naturalmente presente no leite.

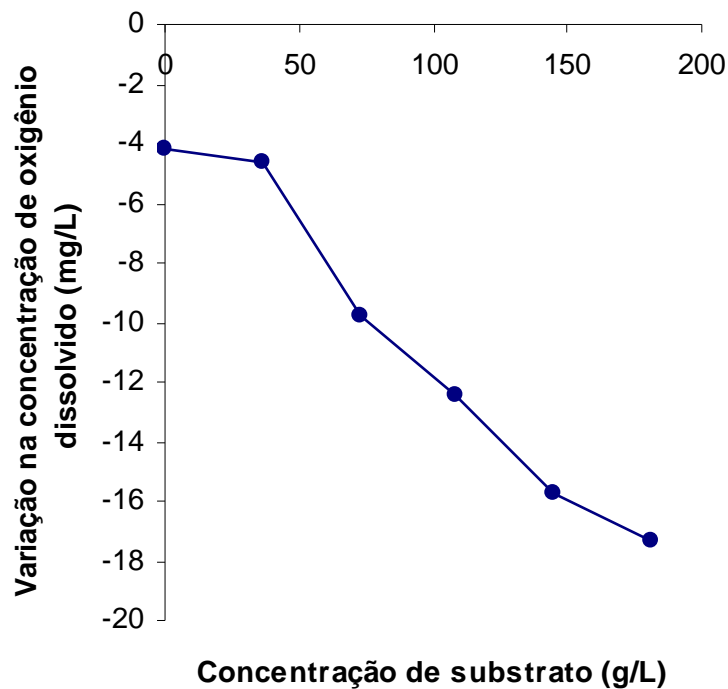


Figura 8. Gráfico evidenciando a atividade tirosinásica no leite.

O controle de qualidade de alimentos enfrenta sempre um problema inicial que é a composição da amostra (o próprio alimento). Os alimentos de uma forma geral apresentam na sua composição uma série de substâncias que podem atuar como inibidores de reação enzimática (PATEL, 2002). No que se refere ao leite, o problema não é diferente. Tanto utilizando-se técnicas moleculares ou analíticas o leite apresenta substâncias que atuem como inibidores (PATEL, 2002; CREMONESI *et al.*, 2006). Cremonesi e colaboradores (2006) desenvolveram um estudo avaliando e otimizando a técnica de extração de DNA do leite, pois esta etapa é decisiva para o sucesso da pesquisa de patógenos no leite, e é neste onde estão presentes gorduras e diferentes íons que podem inibir a *Taq* polimerase. Além desse estudo, Alarcon, Vicedo & Aznar (2006e colaboradores (2005) e Amagliani e colaboradores (2005) também desenvolveram estudos com o mesmo objetivo, desenvolver e otimizar técnicas

moleculares na pesquisa de patógenos no leite. Já sob o aspecto das técnicas analíticas e desenvolvimento de biossensores, também há um número considerável de trabalhos que enfatizam a necessidade do estudo prévio de possíveis interferentes presentes nas amostras (SEZGINTÜRK *et al.*, 2005; FERRINI *et al.*, 2008; SHAN *et al.*, 2008; NUTHUAM *et al.*, 2009). No estudo desenvolvido na Itália em 2008, Ferrini e colaboradores (2008) desenvolveram um biossensor híbrido para detectar e identificar resíduos de β -lactâmicos no leite. Os β -lactâmicos são a principal classe de antibióticos utilizados para o controle de mastite. A droga quando administrada na vaca pode ser liberada no leite. A presença de resíduos de antibióticos no leite pode causar efeitos adversos, como por exemplo, reações alérgicas e outros problemas toxicológicos. Por isso, a pesquisa de antibióticos no leite é muito importante. Os autores optaram por pesquisar a presença de β -lactâmicos, utilizando β -lactamases (enzimas que clivam o anel β -lactâmico) e classes específicas desta enzima para identificar presuntivamente qual antibiótico estava presente no meio. Além disso, nesse mesmo trabalho, os autores ressaltam a importância da preparação da amostra, a fim de se evitar qualquer inibição ou reação indesejada.

5.3. Seleção da melhor diluição da amostra de leite

Pela razão apresentada anteriormente, com intuito de preservar o possível sistema de transdução a ser usado e não acarretar erros de análise foi avaliada a interferência da diluição da amostra na leitura do sinal do eletrodo de oxigênio durante a determinação da atividade da enzima. Nas Figuras 10 e 11 podem ser observadas as curvas da atividade enzimática com a amostra de leite diluída em proporções de 1:2 e 1:10 em solução tampão fosfato 0,2M pH 6,00, respectivamente. Para esses testes a concentração enzimática foi 100 U.mL^{-1} e o tempo de resposta de 5 minutos.

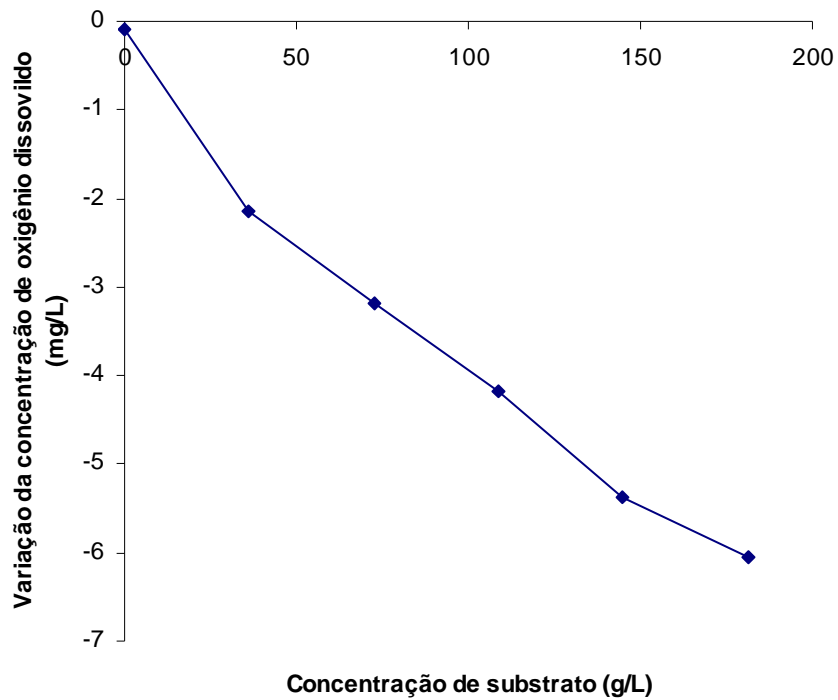


Figura 9. Efeito da diluição (1:2) na atividade enzimática.

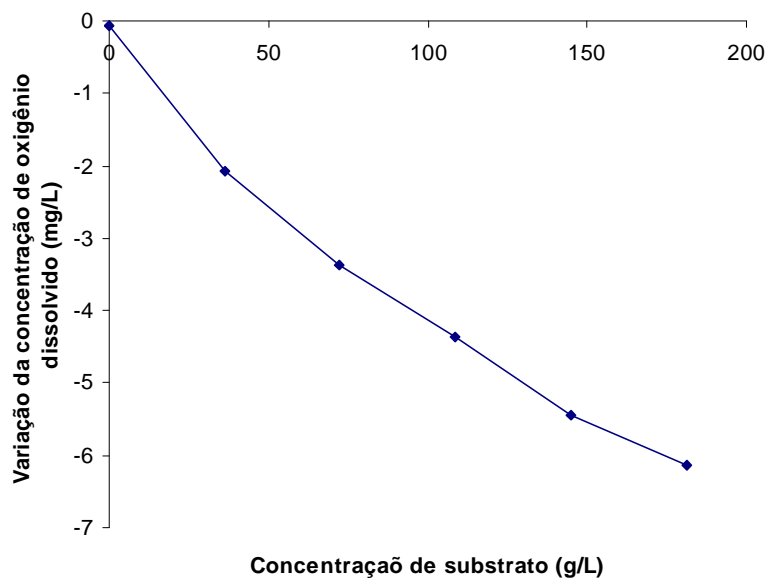


Figura 10. Efeito da diluição (1:10) na atividade enzimática.

Levando-se em consideração que não houve significativa diferença da atividade enzimática nas duas diluições usadas (desvios-padrão semelhantes entre as réplicas, em

ambos casos, e valores da variação da concentração de oxigênio dissolvido, semelhantes nos dois casos), optou-se por utilizar a diluição de 1:10, já que este promovia menor acúmulo de gordura e sólidos no eletrodo. No trabalho de Shan e colaboradores (2008) um dos aspectos avaliados foi à diluição da amostras (refrigerantes de cola e iogurtes). Eles incluíram ainda uma etapa de centrifugação para retirada de sólidos. E observaram também que essa etapa foi importante para a redução significativa de interferentes.

No trabalho de Trivedi e colaboradores (2009) observaram também a necessidade diluição do leite. Neste trabalho, o objetivo era detectar uréia no leite, já que esta substância pode ser usada para adulteração do leite. Em outros diversos trabalhos, o artifício de diluição da amostra é uma saída para eliminação ou redução de inibidores, bem como para proteger o transdutor utilizado no trabalho (ALARCÓN *et al.*, 2006; AMIGLIANI *et al.*, 2006; CREMONESI *et al.*, 2006; FERRINI *et al.*, 2008).

5.4. Seleção do melhor tempo de estabilização do eletrodo e da concentração inicial de oxigênio dissolvido

Outro aspecto que foi levado em consideração foi à estabilização do eletrodo e da concentração de oxigênio dissolvido. A etapa de saturação de oxigênio foi utilizada para diminuir as variações das concentrações iniciais de oxigênio dissolvido nas amostras a serem analisadas. A importância dessa etapa foi descrita por Silva (2009). Após a saturação foi necessário padronizar um tempo em que a variação da concentração de oxigênio dissolvido fosse a menor possível a fim de se começar os testes com a mesma ou a mais próxima concentração de oxigênio dissolvido entre as amostras. Na Figura 12 pode-se observar o gráfico com o estudo do melhor tempo de estabilização do eletrodo e da concentração de oxigênio dissolvido.

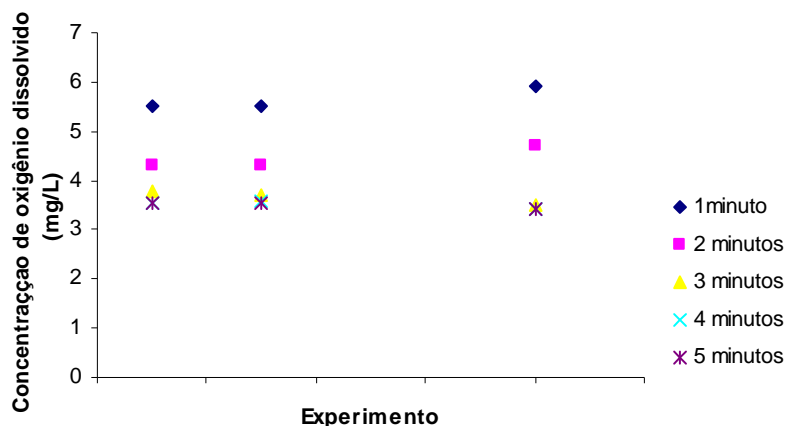


Figura 11. Estudo do melhor tempo de estabilização do eletrodo e da concentração de oxigênio dissolvido (mg/L).

Pode-se observar que a partir do 3º minuto não há significativa variação da concentração de oxigênio dissolvido. Por essa razão, optou-se pelo menor tempo possível inicial de estabilização (3 minutos) para realização dos testes posteriores.

O trabalho de Numthum e colaboradores (2009) utilizaram o eletrodo de oxigênio como transdutor e avaliou a saturação de oxigênio como artifício para obtenção de leitura mais lineares. O objetivo do grupo era monitorar a variação da concentração de oxigênio dissolvido no leite em função da contaminação bacteriana em geral. A queda na concentração de oxigênio dissolvido no leite foi proporcional à contaminação bacteriana no meio. A saturação inicial foi determinante para a redução nas flutuações das leituras.

5.5. Determinação do melhor tempo de resposta

Na etapa seguinte do trabalho, foi determinado o melhor tempo de resposta do método, sendo avaliados tempos de resposta de 3 minutos até 17 minutos. O tempo total de análise foi de 20 minutos, já os 3 minutos iniciais não são levados em consideração, uma vez que não foi adicionado o componente biológico (enzima tirosinase). A tirosinase e o substrato só eram adicionados após os 3 minutos, tempo de estabilização da leitura do eletrodo de oxigênio, sendo então realizadas leituras em mais 17 minutos de análise. As leituras eram feitas de minuto em minuto, sendo o tempo controlado com o auxílio de um cronômetro.

Para a análise do tempo de resposta dos ensaios foram utilizadas: concentração enzimática de 100 U.mL^{-1} e concentrações crescentes de L-tirosina. As figuras abaixo (Figura 13, 14 e 15) mostram os resultados obtidos nesta etapa.

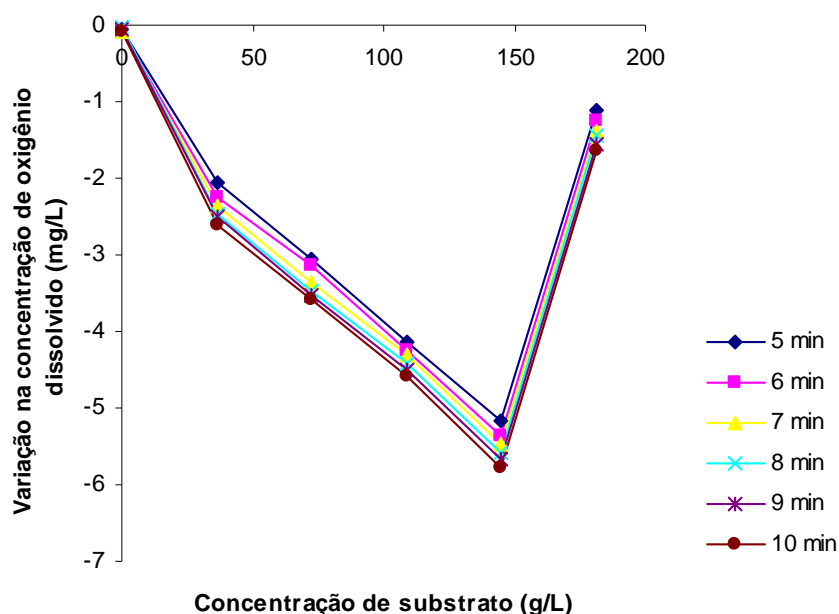


Figura 12. Resultados do teste visando escolha do melhor tempo de resposta (3 min de estabilização + tempo de resposta) de 5, 6, 7, 8, 9 e 10 min.

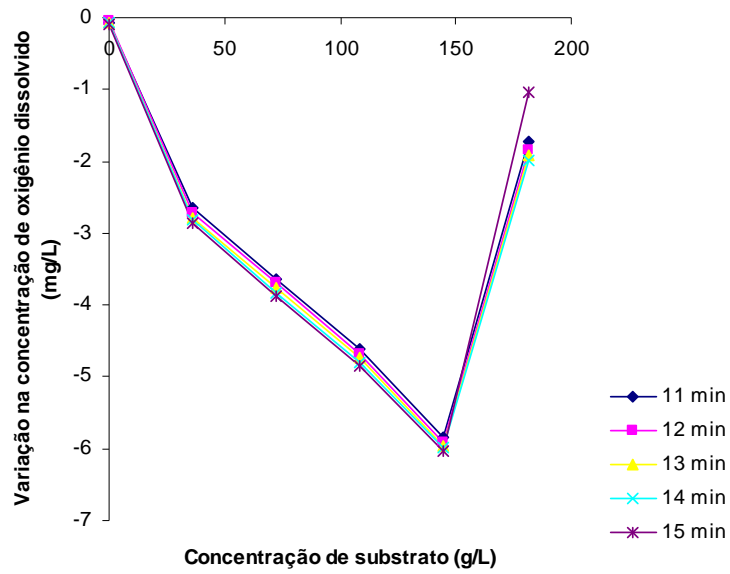


Figura 13. Resultados do teste visando escolha do melhor tempo de resposta (3 min de estabilização + tempo de resposta) de 11, 12, 13, 14 e 15 min.

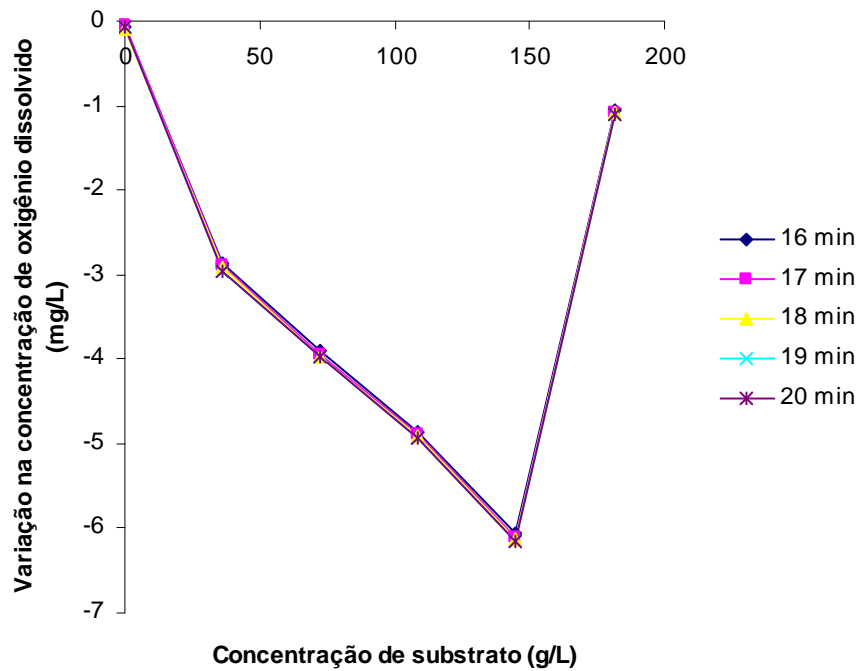


Figura 14. Resultados do teste visando escolha do melhor tempo de resposta (3 min de estabilização + tempo de resposta) de 16, 17, 18, 19 e 20 min.

Nesse teste pode ser observada a variação de oxigênio dissolvido no meio em relação a diferentes concentrações de substrato devido à atividade enzimática ao longo do tempo (5 a 20 minutos totais). Pode-se observar que até os 15 minutos existiu uma queda na concentração, ou seja, o tempo era um fator importante na variável de resposta, que é a concentração de oxigênio dissolvido. Já a partir do 15º minuto não se observou uma variação significativa na concentração de oxigênio ao longo do tempo (curvas se apresentaram sobrepostas indicando que nenhuma variação entre os tempos de reação ocorreu).

Na última concentração de L-tirosina (181,19g/L) foi observado um brusco aumento na concentração de oxigênio dissolvido. Isso pode ter acontecido devido à baixa concentração enzimática utilizada no teste (100 U.mL⁻¹) em relação à concentração de substrato adicionada. Ao aumentarmos a concentração do substrato mantendo a da enzima constante, pode-se rapidamente saturar os sítios ativos da enzima, o que resulta em menor atividade enzimática em função de efeitos inibitórios por excesso de substrato, fato que pode ter ocorrido e por isso ter sido menor a redução da concentração de oxigênio. Quando a concentração do substrato é baixa, a maior parte das moléculas de enzima está livre e pronta para reagir, pois há sítios ativos disponíveis. Quando a concentração do substrato é muito alta, a enzima torna-se saturada com o substrato e praticamente toda a enzima se encontra na forma de complexo enzima-substrato não formando produto e, portanto reduzindo sua atividade (SCHNELL & TURNER, 2004).

No trabalho realizado por Lee e colaboradores (2008), desenvolveram um biochip para detecção de sete agentes causadores de mastite, inclusive o *S. agalactiae*. Um dos aspectos interessantes desse trabalho é a redução no tempo de pesquisa desses

patógenos. A técnica padrão de detecção desses patógenos leva cerca de 36 horas, sendo no biochip 6 horas necessárias de teste. No presente trabalho, o tempo estabelecido foi de 15 minutos, bastante inferior ao requerido pela técnica padrão. O mesmo foi observado em outras propostas semelhantes a essa em trabalhos destinados a outras determinações em que foi possível reduzir o tempo de análise (LEE *et al.*; 2008; FERRINI *et al.*, 2009; TRIVEDI *et al.*, 2009). A redução do tempo de análise é uma das grandes vantagens no desenvolvimento de biossensores.

5.6. Determinação da melhor concentração enzimática e melhor concentração de substrato

Após a determinação do melhor tempo de resposta do método proposto, baseado na atividade enzimática da tirosinase, foram realizados experimentos para determinar e otimizar a concentração enzimática a ser utilizada nas análises. Foram testadas as seguintes concentrações enzimáticas: 200U.mL^{-1} e 400U.mL^{-1} . O tempo de resposta utilizado foi de 15 minutos totais de teste, já determinado anteriormente e concentrações crescentes de L-tirosina até valor de 181,19 g/L. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Tabela com os resultados das variações de oxigênio dissolvido (mg/L) relativos à atividade enzimática para as duas concentrações enzimáticas testadas (200U.mL^{-1} e 400U.mL^{-1}).

| Concentração de L-tirosina (g/L) | Concentração enzimática (U.mL^{-1}) | |
|----------------------------------|--|--------------------|
| | Variação de Oxigênio (mg/L) | |
| | 200 | 400 |
| 0 | $-0,07 \pm 0,05$ | $-0,08 \pm 0,01$ |
| 36,23 | $-2,42 \pm 0,1$ | $-2,44 \pm 0,052$ |
| 72,48 | $-3,49 \pm 0,1$ | $-3,90 \pm 0,015$ |
| 108,71 | $-4,62 \pm 0,1$ | $-5,01 \pm 0,041$ |
| 144,95 | $-5,17 \pm 0,032$ | $-5,96 \pm 0,0058$ |
| 181,19 | $-6,16 \pm 0,036$ | $-6,98 \pm 0,01$ |

A partir da análise dos dados contidos na tabela, optou-se pela concentração de 400U.mL^{-1} para os ensaios de inibição enzimática. As variações de concentração de oxigênio foram maiores com essa concentração e com desvios menores entre as amostras. O menor desvio obtido foi relativo à concentração de $144,95\text{ g/L}$ de L-tirosina e por isso essa concentração de substrato foi também escolhida para os testes futuros de determinação da inibição enzimática da tirosinase. Além disso, pode-se verificar a tendência de aumento numérico da variação de oxigênio dissolvido com o aumento de tempo reacional. Este fato pode ser explicado pelo fato do eletrodo de oxigênio possuir uma membrana que separa o eletrólito interno e os eletrodos (catodo e ânodo) do meio externo. Essa membrana é permeável ao oxigênio que se difunde até o catodo de platina reduzindo-se num processo redox envolvendo 4 elétrons, gerando assim uma corrente proporcional à concentração de oxigênio no meio reacional. Assim, quanto maior for a concentração do substrato na solução a ser analisada (ou solução padrão) e/ou maior o tempo de reação maior será a diminuição observada da concentração de O_2 . As Figuras abaixo (16 e 17) representam os dados mostrados na Tabela 4.

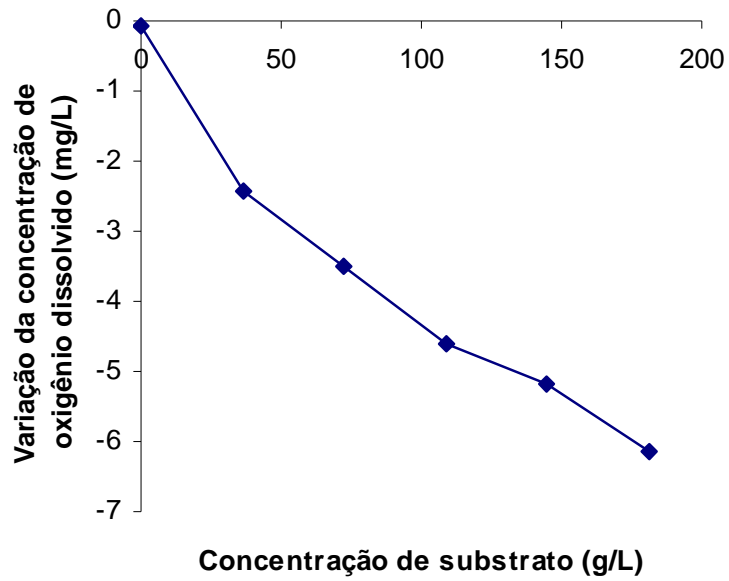


Figura 15. Resultados das variações de oxigênio dissolvido (mg/L) relativos à concentração enzimática de 200U.mL^{-1}

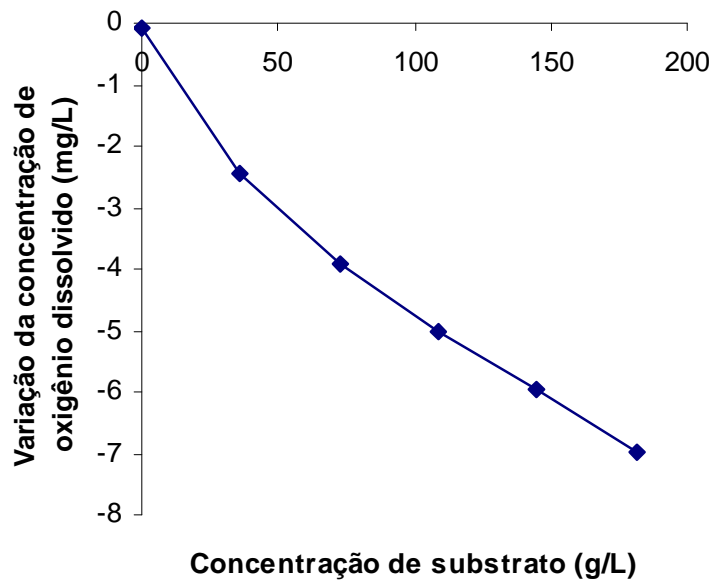


Figura 16. Resultados das variações de oxigênio dissolvido (mg/L) relativos à concentração enzimática de 400U.mL^{-1} .

No trabalho de Amine e colaboradores (2006) a questão da concentração enzimática é avaliada. Os autores concluem que em biossensores amperométricos, a resposta é proporcional à concentração da enzima, ou seja, quanto maior a concentração enzimática, maior será o sinal lido. Na Figura 17, pode-se observar justamente uma maior variação na concentração do oxigênio dissolvido sem a perda da qualidade dos resultados. Meyer e colaboradores (1999) desenvolvendo um biossensor para detecção de β -lactâmicos onde também observaram que quanto mais enzimas utilizavam maior era a detecção dos antibióticos no leite, e este valor era proporcional a real quantidade dessas substâncias nas amostras.

O substrato escolhido para este trabalho foi a L-tirosina, que é um aminoácido não-essencial disponível no laboratório para o estudo. Outros estudos utilizam outros substratos, como o catecol, fenol, *m*-cresol, *p*-clorofenol (ROSSATO *et al.*, 2001; SILVA; 2009). A concentração de L-tirosina selecionada neste estudo para ser aplicada na metodologia, baseado nos resultados obtidos, foi de 144,95 g/L. No estudo de Shan e colaboradores (2008) a concentração estabelecida foi de 0,5g/L, bem inferior ao valor encontrado no trabalho. Porém essa diferença pode ser explicada pela diferença de afinidade entre os diferentes substratos com a enzima tirosinase (ROSSATO *et al.*, 2001; SHAN *et al.*, 2008). O substrato utilizado no trabalho de Shan e colaboradores foi o catecol. Esse substrato é frequentemente utilizado em estudo no qual a tirosinase é o biocomponente (SCHURINK *et al.*, 2007; ZAMORA *et al.*, 2009).

A concentração do substrato também é bastante importante já que no caso de teste de inibição competitiva, concentrações elevadas de substrato competem com o agente inibidor, impedindo que ocorra inibição (AMINE *et al.*, 2006).

5.7. Determinação do intervalo de concentração em que se observa inibição enzimática pelo ácido benzóico

O ácido benzóico é um conhecido inibidor da atividade tirosinásica (DENG & DONG, 1996; ROSSATO *et al.*, 2000; SHAN *et al.*, 2008). Neste trabalho, o ácido benzóico é obtido através da reação da hipuricase com o hipurato de sódio, hipuricase essa produzida pelo *S. agalactiae* (FACKLAM & ELLIOTT, 1995). Por este motivo, o sistema de inibição enzimática é o mais adequado para o desenvolvimento de um biossensor para detecção do *S. agalactiae*.

O conceito biológico de inibidor enzimático diz respeito à substância que é capaz de interferir, de maneira específica, na taxa de uma reação de catálise enzimática, retardando ou reduzindo o processo ou a especificidade biológica da reação. Os processos de inibição de enzimas estão divididos em dois tipos, inibição reversível e inibição irreversível. A diferença básica está na formação do complexo enzima-inibidor, que pode ou não ser desfeito por etapas de diluição ou diálise, dependendo do processo (LEHNINGER *et al.*, 2003). Diferentes inibidores exibem diferentes mecanismos de inibição (DENG & DONG, 1996).

Os processos cinéticos de inibição de enzimas já vêm sendo estudados há várias décadas, objetivando compreender os seus mecanismos de ação, o que tem auxiliado na construção de sistemas analíticos (DIXON, 1964; LEHNINGER *et al.*, 2003). O monitoramento efetuado para estes biossensores aqui descrito, é baseado na capacidade que certos compostos têm de inibirem a reação natural de catálise realizada pela enzima. Dependendo do tipo de inibidor estudado, bem como do processo de inibição a ser monitorado, o biossensor pode ser empregado para diversas determinações. Se o agente de inibição efetuar um processo reversível para com a enzima, o sensor pode ser

reutilizado, após tratamento específico da camada biológica imobilizada, regenerando a capacidade catalítica do biossensor. Caso o inibidor exerça uma inibição irreversível, o sistema apresenta a limitação do uso de apenas uma carga enzimática específica a ser trabalhada por sensor, visto que, com a total inativação desta carga, o biossensor não mais apresenta o processo analítico a ser monitorado (MARQUES & YAMANAKA, 2008).

Nas figuras 18 e 19 são apresentados os resultados encontrados nos testes de inibição enzimática utilizando-se como parâmetros: 5 minutos de saturação de oxigênio, 3 minutos de estabilização do eletrodo, concentração enzimática de $400\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, $144,95\text{ g/L}$ de L-tirosina como substrato e tempo de resposta de 15 minutos. Foram realizadas duas variações, adição do agente inibidor (ácido benzóico) aos poucos, após dez minutos do início da reação enzimática e adição do agente de inibição junto com a enzima e o substrato.

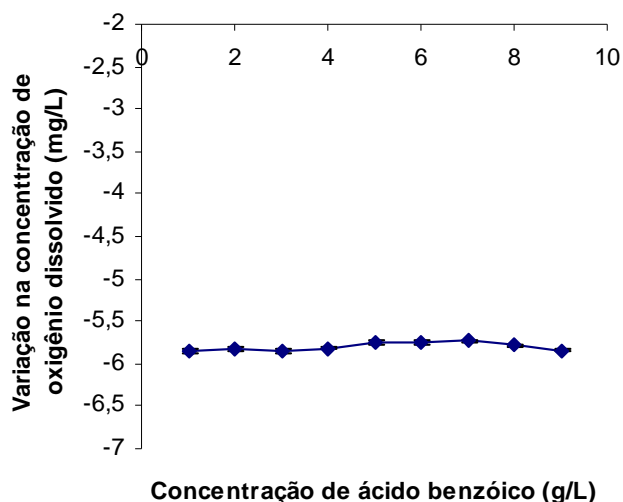


Figura 17. Resultado dos testes de inibição adicionando o inibidor após 10 minutos do início da reação enzimática.

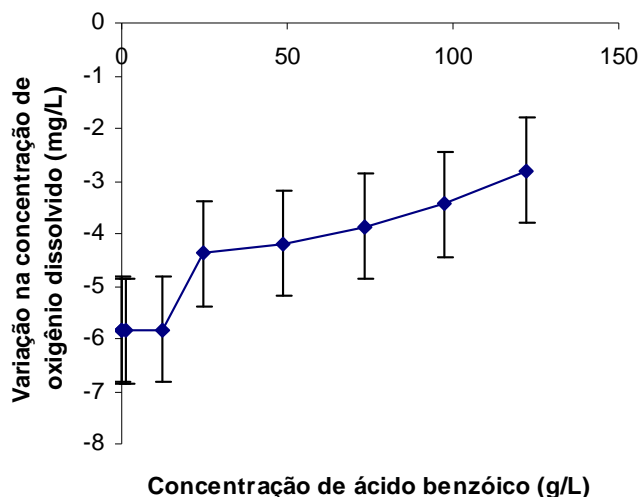


Figura 18. Resultado dos testes de inibição adicionando o inibidor juntamente com a enzima e o substrato.

Um dos objetivos de se estudar a adição do ácido benzóico no início da reação enzimática e após ela já estar ocorrendo foi determinar qual tipo de inibição ocorreria no sistema proposto, competitivo ou não competitivo.

No processo de inibição competitiva, o inibidor geralmente apresenta características estruturais e afinidades semelhantes às do substrato ao qual ele está interferindo, competindo com este pelo mesmo sítio de ligação da enzima. Uma vez que este inibidor consegue se ligar à enzima, esta não o converte em produto, levando à formação de um complexo inativo, o que impede a enzima de efetuar nova catálise (MARQUES & YAMANAKA, 2008).

No processo de inibição não competitiva, o inibidor liga-se a um sítio diferente do sítio de ligação do substrato, o que indica que a inibição não pode ser revertida pela adição de quantidades de substrato. Ocorre a formação de complexos, tanto entre a enzima e o inibidor, quanto entre este e o substrato. Um

inibidor não competitivo apresenta um comportamento de remoção da enzima ativa da solução, o que resulta na diminuição da velocidade da reação, devido à quantidade de enzima livre (LEHNINGER *et al.*, 2003; STANCA & POPESCU; 2004).

O limite mínimo de detecção de inibição enzimática para o sistema foi de 24,424 g/L de ácido benzóico, não sendo possível nas condições estabelecidas neste trabalho detectar variação na atividade da enzima em concentrações menores do que esta (observada na figura 18). Além disso, a inibição foi do tipo competitiva, pois se observou um aumento na concentração de oxigênio dissolvido no meio quando se adicionou o ácido benzóico no início da reação junto com o substrato e a enzima. Observou-se uma maior inibição a partir da concentração de 24,424 g/L de ácido benzóico. Nas concentrações menores não houve inibição, provavelmente por não possuir quantidade suficiente de inibidor para impedir a atividade da enzima, ou seja, deixando uma quantidade de enzima livre para realizar a reação catalítica (MARQUES & YAMANAKA, 2008).

Esse mesmo comportamento foi encontrado no trabalho de Shan e colaboradores (2007). Já quando foi adicionado o ácido benzóico após 10 minutos de reação nenhuma variação da concentração de oxigênio dissolvido foi observada (figura 17), ou seja, pode ter havido também inibição ou não. Neste caso como o inibidor só foi adicionado após 10 minutos, a reação enzimática poderia já ter atingido sua máxima atividade não sofrendo influência do ácido benzóico adicionado.

No trabalho realizado na China por Shan e colaboradores (2007) o limite de detecção de ácido benzóico foi bem menor que o encontrado neste trabalho

(0,024g/L). No entanto, não utilizaram a enzima livre, mas sim fixada numa matriz de poliacrilonitrila, o que segundo os autores pode explicar a diferença dos resultados deles com os comumente encontrados na literatura.

Cabe ressaltar que a comparação com trabalhos da literatura é difícil, pois não foram encontrados trabalhos com propostas semelhantes a esta. De uma forma geral, a pesquisa de patógenos é feita utilizando-se técnicas de cultivo ou biologia molecular. No que se refere à pesquisa de patógenos com o auxílio de biossensores, são pouquíssimos os trabalhos, principalmente os que optam por utilizar as enzimas como componentes biológicos e sistema de transdução amperométrico.

No que se refere à estimativa de contagem de células, esta é realizada em função de curvas de calibração, ou seja, suspensões bacterianas com concentração celular definida devem ser submetidas ao substrato hipurato de sódio e posteriormente um dos produtos da reação, o ácido benzóico, detectado pelo sistema apresentado neste trabalho. Em função da concentração de ácido benzóico, pode-se extrapolar, através da curva de calibração, a concentração celular. Pode-se também determinar a concentração de ácido benzóico, em relação à diminuição da concentração de hipurato de sódio, já que uma unidade de hipurato de sódio, após a ação da enzima, tem como produto uma unidade de ácido benzóico, permitindo assim o estabelecimento de uma relação (MACFADDIN, 1976). No entanto, a curva de calibração é extremamente importante, pois a produção da enzima hipuricase está relacionada ao número de células no leite e também a expressão dos genes que são transcritos e traduzidos

na enzima hipuricase, assim para alcançar o desenvolvimento futuro do biossensor esta curva deverá ser obtida.

CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES

Streptococcus agalactiae é um microrganismo que continua sendo um problema no que se refere à mastite, principalmente a subclínica. As técnicas para sua detecção são laboriosas e demoradas. A partir dos resultados obtidos durante este trabalho, podem ser tiradas as seguintes conclusões descritas a seguir:

1. Os valores de atividade enzimática da enzima tirosinase obtida dos lotes de cogumelo *Agaricus bisporus* utilizado no trabalho variaram de 50 U/mL a 200U/mL;
2. A tirosinase exibiu atividade no leite, ou seja, o leite não causou inibição na atividade enzimática apesar da sua complexa composição;
3. A melhor diluição da amostra de leite foi de 1:2, mas a diluição 1:10 em tampão fosfato 0,2M pH6,00 foi a que promoveu menor acúmulo de resíduos na membrana do eletrodo usado como detector, e que será usado na confecção do futuro biossensor como transdutor;
4. O melhor tempo de estabilização do eletrodo de oxigênio e da concentração de oxigênio nas amostras saturadas foi de 3 minutos, ou seja, tempo em que não se observou variação na concentração de oxigênio dissolvido e, portanto variação do sinal lido;
5. O melhor tempo de resposta para a atividade tirosinásica neste trabalho foi de 15 minutos, neste tempo foi obtido o maior valor de leitura de sinal do eletrodo de oxigênio (maior sensibilidade do método), não sendo a partir deste tempo nenhuma variação significativa observada nas condições fixas selecionadas.

6. A melhor concentração enzimática foi de 400U/mL, pois apresentou menores desvios-padrão entre as amostras e maiores valores dos sinais de leitura obtidos, garantindo a segurança na análise, além de permitir a ampliação da análise até concentrações de 181,19g/L de L-tirosina, o que não foi possível usando 100 U/mL de enzima;

7. A melhor concentração de substrato (L-tirosina) a ser usada determinada experimentalmente foi de 144,95g/L. Também nesta concentração foi observada a maior variação na concentração de oxigênio com os menores desvios-padrão;

8. O limite Inferior de detecção de concentração de ácido benzóico para este sistema foi de 24,424 g/L, ou seja, em valores inferiores a este não foi verificada inibição da atividade da enzima tirosinase e, portanto, não foi observada redução no consumo de oxigênio no sistema. Esta etapa foi fundamental, pois poderá ser determinada pela estequiometria da reação da *S. agalactiae* que quantidade destes contaminantes precisará ter presentes nas amostras de leite de modo que nosso método, proposto da forma como é apresentado, seja suficientemente sensível para detectar sua presença.

9. O processo de inibição foi do tipo competitiva já que só foi observada inibição quando o inibidor era adicionado juntamente com a enzima e o substrato, ou seja, o inibidor provavelmente compete pelos sítio ativo da enzima com o substrato;

10. O sistema, da forma como proposto, é capaz de detectar a inibição da enzima tirosinase pela presença do ácido benzóico, e portanto, poderá ser usado na construção

futura do biossensor para detecção de *Streptococcus agalatae* em amostras de leite contaminadas.

CAPÍTULO 7: SUGESTÕES

- ❖ Realização de testes usando amostras de leite contaminadas artificialmente por *S. agalactiae*; sendo esta etapa futura importante para testes de sensibilidade do sistema, aplicando-se os valores já identificados neste trabalho;
- ❖ Testar um método de imobilização da enzima tirosinase de modo que esta possa ser reutilizada, reduzindo ainda mais os custos e possibilitando a construção do instrumento biossensor;
- ❖ Montar o biossensor pensando na melhor forma de acoplar o instrumento a uma linha de análise FIA (*Flow Injection Analysis*), por exemplo, para introdução dos reagentes necessários, ou mesmo adicioná-los na amostra direto nas quantidades pré-determinadas e colocar a amostra em contato com o biossensor enzimático a ser projetado;
- ❖ Após determinar as características do biossensor realizar testes com amostras reais para comprovar a eficácia do novo instrumento;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALARCÓN, B.; VICEDO, B. & AZNAR R. (2006). PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *J. Applied. Microb.* 100:352-364.

ALKYILMAZ E. & KOZGUS, O (2009). Determination of calcium in milk and water samples by using catalase enzyme electrode. *Food Chemistry*. 115: 347-351.

AMAGLIANI, G.; OMICCIOLI, E.; DEL CAMPO, A.; BRUCE, I.J.; BRANDI, G. & MAGNANI, M. (2006). Development of a magnetic capture hybridization-PCR assay for *Listeria monocytogenes* direct detection in milk samples. *J. Applied. Microb.* 100: 375-383.

AMINE, A.; MOHAMMADI, H.; BOURAIS, I. & PALLESCHI, G. (2006). Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors & Bioelectronics*. 21: 1405-1423.

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

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

BAKER C.J.. 1977. Summary of the Workshop on Perinatal Infections Due to Group B *Streptococcus*. *J Infect Dis*. 136:137-52.

BAUDRY, C., DE CREMOUX, R., CHARTIER, C. & PERRIN, G. 1997. Impact of the cellular concentration of milk in goats on its production and its composition. *Vet. Res*, 28: 277-286.

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

BLOCK, T.; MUNSON, E.; CULVER, A.; VAUGHAN, K.; HRYCIUK, J. E. (2008). Comparison of carrot broth- and selective todd-hewitt broth-enhanced PCR protocols for real-time detection of *Streptococcus agalactiae* in prenatal vaginal/anorectal specimens. *J. Clin. Microb.* 46:3615-3620.

BOGUE, R. (2005). Developments in biosensors – where are tomorrow’s markets? *Sensor Review*, v. 25, nº3, p.180-184.

BRITO, M.A.V.P., ARCURI, E.F., BRITO, J.R.F. (2000). Testando a qualidade do leite. In: DURÃES, M.C.; MARTINS, C.E.; DERESZ, F.; BRITO, J.R.F.; FREITAS, A.F.; PORTUGAL, J.A.B.; COSTA, C.N. MINAS LEITE. 2., 2000, Juiz de Fora. Avanços tecnológicos para o aumento da produtividade leiteira. Anais... Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. p.83-94.

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

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

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

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

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

CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B.; MALFERRARI, G.; BIUNNO, I.; VIMERCATI, C.; MORONI, P.; MORANDI, S. & LUZZANA, M. (2006). Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. *J. Dairy Sci.* 89:163-169.

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

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

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

DENG, A. P.; YANG, H. (2007) A multichannel electrochemical detector coupled with an ELISA microtiter plate for the immunoassay of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Sensors and Actuators*, v. 124, p. 202-208.

DENG, Q. & DONG, S. (1996). Amperometric biosensor for tyrosinase inhibitors in a pure organic phase. *The Analyst*. 121: 1979-1982.

DIXON, M.; WEBB, E. C. (1964). *Enzymes*, 2-ed., Longmans: London.

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

EBERHARD, R.J., HARMON, R.J., JASPER, D.E., NATZKE, R.P., NICKERSON, S.C., RENEAU, J.K., ROW, E.H., SMITH, K.L. & SPENCER, S.B. 1987. Current concepts of bovine mastitis. *The National Mastitis Council*, VA, USA.

FACKLAM, R.R., & ELLIOTT, J. (1995) Identification, classification and clinical relevance of catalase-negative, Gram positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 479-495.

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

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

FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M.D.(1992). Biossensores. *Química Nova*, v. 15, n. 1, p.28-39.

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

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

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

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

FERRINI, A. M.; MANNONI, V.; CARPICO, G. & PELLEGRINI, G. E. (2008). Detection and identification of β -lactam residues in milk using a hybrid biosensor. *Agric. Food Chem.* 56: 784-788.

FONSECA, L.F.L. & SANTOS, M.V. 2000. Qualidade do leite e controle da mastite. São Paulo. Lemos Editorial, 175p.

GILLIS, E. H.; GOSLINGJ, P.; SREENAN, J. M.; KANE, M. (2002). Development and validation of a biosensor-based immunoassay for progesterone in bovine milk. *Journal of Immunological*, v.267, n.2, p.131-138.

HABAUZIT, D.; CHOPINEAU, J.; ROIG, B. (2007). SPR-based biosensors: a tool for biodetection of homonal compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 387, n. 4, p. 1215-1223.

HARDIE, J. M. & WHILEY, R.A. 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement*, 83: 1S-11S.

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

HUMTHUAM, S.; SUZUKI, H.; FUKUDA, J.; PHUNSIRI, S.; RUNGCHANG, S. & SATAKE, T. (2009). Rapid measurement and prediction of bacterial contamination in milk using an oxygen electrode. *Food. Pathog. Dis.* 6: 187-191.

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

IVNITSKI, D.; HAMID, I. A.; ATANASOV, P.; WILKINS, E., STRICKER, S. (2000). Application of electrochemical biosensors for detection of food pathogenic bacteria. *Electroanalysis*, v. 12, n. 5, p. 317-325, 2000.

JAWAHEER, S.; WHITE S. F; RUGHOOPUTH, S. D. D. V.; CULLEN, D. C. (2003). Development of a common biosensor format for an enzyme based biosensor array to monitor fruit quality. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 18, p.1429-1437.

JAYARAO, B. M.; PILLAI, S. R.; SAWANT, A. A.; WOLFGANG, D. R. & HEDGE, N. V. (2004). Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. *J. Dairy Sci.* 87:3561-3573.

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

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

KEEFE, G.P. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can. Vet. J.*, **38**: 429-437.

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

KILIAN, M. 1998. *Streptococcus* and *Lactobacillus*. In: Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. Collier, L., Balws, A. & Sussman, M. (ed). 9th edition (vol.2), Edward Arnold, London, UK. p. 633-667.

KISSINGER, P. T. (2005). Biosensors- a perspective. *Biosensors & Bioelectronics*. 20: 2512-2516.

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

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

KRUG, E.E.B., REDIN, O., KODAMA, H.K., CATTELAN, A.J., VECCHI, J.A., ANDRADE, T.P. & PIANTA, C. 1990. Mamite bovina. Porto Alegre, Cooperativa Central de leite Ltda, 85p.

LANCEFIELD, R.C. 1933. A sorological differentiation of human and other group of haemolytic streptococci. *J. Exp. Med.*, 57: 571-595.

LANCEFIELD, R.C. 1934. A sorological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (Group B). *J. Exp. Med.*, 59: 441-458.

LANGENEGGER, J., VIANI, M.C.E. & BAHIA, M.G. 1981. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. *Pesq. Vet. Bras.*, 1: 47-52.

LEE, K. H.; LEE, J. W.; WANG, S. W.; LIU, L. Y.; LEE, M. F.; CHUANG, S. T.; SHY, Y. M., CHANG, C. L.; WU, M. C.; CHI, C. H. (2008). Development of a novel biochip for rapid multiplex detection of seven mastitis-causing pathogens in bovine milk samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20: 463-471.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. M. (2003). *Princípios de bioquímica*, 3.ed. Sarvier: São Paulo.

MAC FADDIN, J. F. (ED). 1976. Biochemical test for identification of medical bacteria. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA.

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

MARQUES, P. R. B. O. & YAMANAKA. (2008). Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. *Química Nova*. 31:1791-1799.

MEATPROCESS.COM. *New biosensor designed for poultry industry*. Disponível em: <<http://meatprocess.com/Products/New-biosensor-designed-for-poultry-industry>>. Acesso em: 15 dez 2009.

MEDICAL NEWS TODAY. *New portable biosensor detects traces of contaminants in food, is quicker and more economical*. Disponível em: <<http://www.medicalnewstoday.com/articles/71289.php>>. Acesso em: 15 dez 2009.

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

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

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

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

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

PATEL, P.D. (2002). (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *Trends. Analit. Chem.* 21: 96-114.

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

PERRIN, G.G., MALLEREAU, M.P., LENFANT, D. & BAUDRY, C. 1997. Relationships between California Mastitis Test (CMT) and somatic cell counts in dairy goats. *Sm. Rum Res.* 26: 167-170.

PESSANHA, L. D. R. (2001). Pobreza, Segurança Alimentar e Políticas Públicas: Contribuição ao Debate Brasileiro. (texto apresentado no Seminário "Sistemas Locais de Segurança Alimentar" realizado no Instituto de Economia da Unicamp em novembro de 2002. 1: Estimativa de Beneficiários de Programas de Combate à Fome.

- PRITCHARD, D.G., GRAY, B.M. & DILLON, H.C. JR. 1984. Characterization of the group-specific polysaccharide of group B *Streptococcus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 235: 385-392.
- ROMANI, A., MINUNNI, M., MULINACCI, N., PINELLI, P., VINCIERI, F. F. (2000) Comparison among differential pulse voltammetry, amperometric bisensor, and HPLC/DAD analysis for polyphenol determination. *Journal Agric. Food Chem*, v. 48, pp. 1197-1203.
- ROS, J. R., RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N., GARCIA-CANOVAS, F. (1994) Tyrosinase: kinetics analysis of transient phase and steady state. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1204, pp. 33-42.
- ROSATTO, S. S. (2000) Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e sílica modificada. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- ROSATTO, S. S., FREIRE, R. S., DURÁN, N., KUBOTA, L. T. (2001) Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova*, v. 24, n. 1, pp. 77-86.
- SALGADO, A. M. (2001) Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- SANCHEZ-FERRER, A., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N., GARCÍA-CÁNOVAS, F., GARCÍA-CARMONA, F. (1995) Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1247, pp.1-11.
- SCHNELL S., TURNER T.E. (2004). "Reaction kinetics in intracellular environments with macromolecular crowding: simulations and rate laws". *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 85 (2–3): 235-60.
- SEO, S. Y., SHARMA, V. K., SHARMA, N. (2003) Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 10, pp. 2837-2853.

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

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

SEZGINTÛRK, M. K.; GÖKTUNG, T. & DINÇKAYA, E. (2005b). A biosensor based on catalase for determination of highly toxic chemical azide in fruit juices. *Biosensors & Bioelectronics*. 21:684-688.

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

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

SHAN, D.; SHI, Q.; ZHU, D. & XUE, H. (2007). Inhibitive detection of benzoic acid using a novel phenols biosensor based on polyaniline-polyacrylonitrile composite matrix. *Talanta*. 72: 1767-1772.

SILVA, L. M. C. ; SALGADO, A. M. ; COELHO (2010). *Agaricus bisporus* as a source of tyrosinase for phenol biosensor development. *Environmental Technology*.

SILVA, P.H.F.; PEREIRA, D.B.C.; OLIVEIRA, L.L. & COSTA JÚNIOR, L.C.G. (1997). *Físico-química do leite. Métodos analíticos*. Juiz de Fora: Gráfica Oficina de Impressão.

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

SKOTTRUPA, P. D.; NICOLAISENB, M.; JUSTESEN, A. F. (2008). Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, p. 339-348.

- STANCA, S. E. & POPESCU, I. C. (2004). Amperometric study of the inhibitory effect of carboxylic acids on tyrosinase. *J. Mol. Cat. B: Enzymat.* 27:221-225.
- TEMBE, S., INAMDAR, S., HARAM, S., KARVE, M., D'SOUZA, S. F. (2007) Electrochemical biosensor for catechol using agarose–guar gum entrapped tyrosinase. *Journal of Biotechnology*, v. 128, pp. 80–85.
- THÉVENOT, D. R., TOTH, K., DURST, R. A., WILSON, G. S. (2001) Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, pp. 121-131.
- TIMUR, S., PAZARLIOGLU, N., PILLOTON, R., TELEFONCU, A. (2004) Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix. *Sensors and Actuators B*, v. 97, pp. 132–136.
- TOMITA, I. N., MANZOLI, A., YAMANAKA, F., YAMANAKA, H. (2005) Amperometric biosensor for ascorbic acid. *Eclética Química*, v. 30, n. 2, pp. 37-43.
- TOPÇU, S., SEZGINTÜRK, M. K., DINÇKAYA, E. (2004) Evaluations of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 20, pp. 592-597.
- TRIVEDI, U. B.; LAKSHMINARAYANA, D.; KOTHARI, I. L.; PATEL, N. G.; KAPSE, H. N.; MAKHIJA, K. K.; PATEL, P. B. & PANCHAL, C. J. (2009). Potentiometric biosensor for urea determination in milk. *Sensors and Actuators*.
- VAN GELDER, C. W., FLURKEY, W. H., WICHERS, H. J. (1997) Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, v. 45, n. 7, pp. 1309-1323.
- VELASCO-GARCIA, M. N., MOTTRAM, T. (2003) Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystem Bioengineering*, v. 84, pp. 1-12.
- WESSELS, M.R., RUBENS, C.E., BENEDI, V-J & KASPER, D.L. 1989. Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 8983-8987.

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

YAMAGATA, M., GOODGER, W.J., WEAVER, V.M.D. & FRANTI, C. (1998) The economic benefit of treating subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in lactating cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 191: 1556-1561.

YANCEY M.K., SCHUCHAT A., BROWN L.K., VENTURA V.L.& MARKENSON G.R. (1996) The accuracy of late antenatal screening cultures in predicting genital group B streptococcal colonization at delivery. *Obstet Gynecol* . 88:811-5.

ZAMORA, M. E. M.; MELGAREJO, F.R.; GARCIA-CÁNOVAS, F. & GÁRCIA-RUIZ, P. A. 2007. Effects of the immobilization supports on the catalytic properties of immobilized mushroom tyrosinase: A comparative study using several substrates. *Journal of Biotechnology*. 4: 388-396.

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