



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**CONSTRUÇÃO DE UM BIOSSENSOR PARA O
DOSEAMENTO DE UREIA BASEADO NA INIBIÇÃO
ENZIMÁTICA DA AMIDASE DE *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* COM RECURSO A UM ELÉCTRODO
SELECTIVO DE IÕES AMÓNIO**

Ana Rita Dantas Balsemão Barbosa
(Licenciatura em Engenharia Química)

TRABALHO FINAL DE MESTRADO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM ENGENHARIA QUÍMICA

Orientador:
Professor Doutor Amin Karmali

Júri:
Doutor João Fernando Pereira Gomes
Doutor Amin Mahomed Vissanji Karmali
Doutor Luís Joaquim Pina da Fonseca

DEZEMBRO DE 2008

Aos meus irmãos,
Aos meus lindos sobrinhos
Catarina e Rafael,
Ao João.

AGRADECIMENTOS:

A realização deste trabalho, não teria sido possível sem a colaboração e o apoio de várias pessoas, a quem desta forma desejo expressar o meu agradecimento:

Ao Professor Doutor Amin Karmali, meu orientador e Coordenador do Centro de Investigação de Engenharia Química e Biotecnologia do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, o apoio e orientação prestados, assim como pelo seu empenho, disponibilidade e simpatia durante a realização do trabalho pela confiança depositada em mim e pela oportunidade que me deu de participar neste projecto de investigação.

À Eng^a Isabel João pelos ensinamentos prestados, e pela grande prontidão, disponibilidade e simpatia com que me auxiliou num primeiro contacto com a metodologia de Design Experimental (ANOVA).

À Eng^a Ana Sofia Figueiredo da secção de Tecnologia Química agradeço a inteira disponibilidade e imensa simpatia com que me auxiliou na manipulação dos biorreactores.

À Doutora Rita Pacheco pela compreensão, simpatia, boa disposição e palavras de ânimo e de apoio que me permitiram recuperar a confiança e o equilíbrio nos momentos mais difíceis deste percurso.

À Doutora Sónia Martins pela paciência, compreensão e apoio.

Ao Dr. João Gomes, ao Eng^o Jaime Puna ao Eng^o Braulio Baptista e a toda a secção de Tecnologia Química, por me terem acolhido tão afavelmente e por me terem feito sentir em casa.

Ao Eng^o Nelson Silva pela grande disponibilidade e simpatia com que acolheu todas as minhas questões desde as mais pertinentes às mais improváveis.

À secção de Poluição por me terem disponibilizado as suas instalações e por se terem mostrado todos tão prestáveis e disponíveis em ajudar.

À Eng^a Magda Semedo, Eng^a Dulce Gil e D^a Sandra Silva agradeço a simpatia, disponibilidade, compreensão, paciência e ajuda.

To Simona who came and went away so fast, and that teached me so much in so little time, thank you for your friendship.

À Cláudia que mostrou o seu imenso potencial humano e cujo apoio e palavras se mostraram tão valiosos, muito obrigada.

À Ana Fragoso, Patrícia Borges, Viviana Carvalho e Andreia Mendonça, agradeço os momentos de ajuda, partilha, brincadeira e diálogo. À Ana Catarina Santos, Gonçalo e Susana sempre divertidos e tremendamente humanos agradeço a vossa amizade e apoio. À minha amiga Rita Franco por se mostrar sempre tão compreensiva e paciente. À Sara Silva e à Inês Borralho pelos momentos de descontração e diversão que trouxeram alguma cor aos dias mais cinzentos e pela sua paciência e compreensão.

À Marta Arneiro por ser a minha confidente e amiga e por nunca me ter negado o seu apoio.

À minha família com a qual construí os meus alicerces e em particular ao meu Pai cuja força, compreensão, disponibilidade e apoio foram imprescindíveis nesta fase da minha vida.

À minha irmã Mafalda pela sua compreensão e apoio e aos meus lindos sobrinhos Catarina e Rafael para os quais não pude estar tão presente.

Ao João, por todo o apoio e por tudo o que tem feito por mim ao longo destes anos e para o qual todas as palavras de agradecimento são poucas, obrigada por tudo.

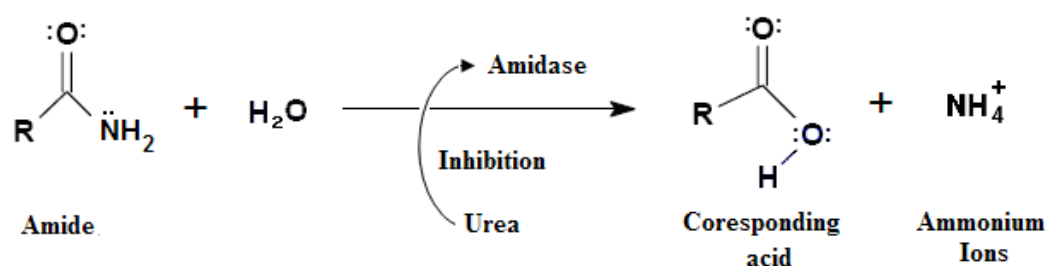
À D^a Piedade pelos bons conselhos, força e mimos e ao Luís pela sua paciência e compreensão.

estabilidade de armazenamento por um período de 55 dias revelando uma perda de apenas 15% da sua resposta. O biossensor desenvolvido apresenta uma sensibilidade de 58,245 mV.min⁻¹ e um tempo de resposta de aproximadamente 20s. A resposta do biossensor foi linear para concentrações de ureia presentes no vinho na gama de 4-10 µM de ureia.

Palavras-chave: Biossensor de ureia, amidase alifática de *Pseudomonas aeruginosa*, eléctrodos selectivos de iões, membranas de polieter sulfona, inibição pela ureia, leite e vinho.

ABSTRACT:

The aim of the present work was the development of an inhibition based biosensor using cell-free extracts of *Pseudomonas aeruginosa* based on ion-selective electrode (ISE) for assay of urea in food samples. Urea is a powerful time-dependent active-site directed inhibitor for aliphatic amidase (acylamide amidohydrolase EC 3.5.1.4) from *Pseudomonas aeruginosa* which catalyses the hydrolysis of a small number of aliphatic amides producing the corresponding acid and ammonia according to the following reaction:



Cell-free extracts containing amidase activity from *Pseudomonas aeruginosa* L10 were immobilized on nylon Porablot NY Plus and on altered polyethersulfone membranes (PES) in the presence of gelatin and glutaraldehyde as the bi-functional reagent. These membranes were used to set up a biosensor based on ISE for ammonium ions by using acetamide as the substrate, and the enzyme reaction was followed by measurement of ammonium ions due to hydrolysis of acetamide. Biosensor response was presented as the initial rate of reaction in $\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$.

The optimization of immobilization parameters was carried out according to ANOVA methodology. Therefore, the mixture of 30 μL of cell-free extract, 2 μL GA (5%) and 10 μL Gelatin 15% (w/v) exhibited the best biosensor response. Some experimental parameters such as pH and incubation time in 2 μM urea were also optimized. The best biosensor response was obtained to pH 7,2 and the optimum incubation period in urea solutions was 20 min. The inhibition response of the biosensor was given as the change in biosensor response after incubation in the urea solution ($\Delta\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$).

Three calibration curves for this biosensor were carried out in buffer solution, milk and wine exhibiting a limit of detection of $2,0 \times 10^{-6}$ M urea. A recovery of 70% of enzyme activity was observed by incubating these membranes for two hours in 2M hydroxylamine. The biosensor exhibited good storage stability for a period of 55 days

with a loss of only about 15% of biosensor response, it showed a linear response in the range of 4-10 μM de ureia, and a response time of 20s and the biosensor sensitivity was 58,245 $\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$.

Key-Words: Biosensor for urea, aliphatic amidase from *Pseudomonas aeruginosa*, ion selective electrode, polyethersulfone membrane, inhibition by urea, milk and wine.

AGRADECIMENTOS:.....	III
RESUMO:.....	V
ABSTRACT:	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUÇÃO:	2
1.1 UREIA:	2
1.2 BIOSSENSORES:	4
1.2.1 Características de um biossensor ideal:	5
1.2.1.1 Sensibilidade:	6
1.2.1.2 Linearidade:	6
1.2.1.3 Limite de detecção:	7
1.2.1.4 Selectividade:	7
1.2.1.5 Tempo de vida:	7
1.2.1.6 Histerese:	8
1.2.1.7 Resposta Dinâmica:	8
1.2.2 Classificação:	8
1.2.2.1 Biossensores Electroquímicos:	9
1.2.2.1.1 Biossensores Condutimétricos:	9
1.2.2.1.2 Biossensores Amperométricos:	9
1.2.2.1.3 Biossensores Potenciométricos:	10
1.2.2.1.3.1 Eléctrodo selectivo de iões amónio:	10
1.2.2.2 Biossensores ópticos:	11
1.2.2.3 Biossensores Calorimétricos:	11
1.2.2.4 Biossensores Piezoelectrónicos:	11
1.3 BIOSSENSORES BASEADOS NA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA:	11
1.3.1 Princípio de funcionamento de um biossensor baseado na inibição enzimática:	12
1.3.2 Imobilização enzimática:	13
1.3.3 Sistema Enzima/Inibidor:	13
1.3.3.1 Inibição Reversível:	13
1.3.3.2 Inibição Irreversível:	15
1.3.4 Limite de Detecção:	16
1.3.5 Regeneração:	16
1.3.6 Parâmetros que afectam a performance do biossensor:	17
1.3.6.1 Efeito do pH:	17
1.3.6.2 Efeito da concentração de substrato:	17
1.3.6.3 Efeito da concentração de enzima:	18
1.4. DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO EM FASES ORGÂNICAS:	18
1.5. IMOBILIZAÇÃO:	19
1.5.1 Imobilização por Ligação covalente:	19
1.5.2 Imobilização por Ligação Covalente Cruzada:	21
1.5.2.1 Glutaraldeído:	22
1.6 PSEUDOMONAS AERUGINOSA:	25
1.7 AMIDASE:	26
1.7.1 Estrutura da amidase:	26
1.7.2 Inibição da amidase pela ureia:	30
1.18 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA O DOSEAMENTO DA UREIA	31

2. MATERIAIS E MÉTODOS:	34
2.1. REAGENTES:	34
2.2 MATERIAIS:	34
2.3 MÉTODOS:	34
2.3.1 Estirpe bacteriana, meio e condições de crescimento para a produção de enzima	34
2.3.1.1 Selecção de colónias produtoras de amidase	35
2.3.1.2 Crescimento de células em descontínuo	35
2.3.1.3 Crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> L10 em batch no fermentador de laboratório	35
2.3.2 Conservação de células	35
2.3.3 Preparação do extracto celular	36
2.3.4 Determinação de proteína	36
2.3.5 Determinação da actividade enzimática da amidase no extracto celular por Potenciometria	36
2.3.6 Optimização das condições de imobilização:	37
2.3.6.1 Influência da [Glutaraldeído]	38
2.3.6.2 Influência da [Gelatina]	38
2.3.6.3 Influência da quantidade de extracto celular	38
2.3.6.4 Planeamento experimental para a optimização dos parâmetros intervenientes na imobilização:	39
2.3.7 Optimização do pH de imobilização	39
2.3.8 Determinação da influência do tempo de incubação com a ureia	40
2.3.9 Doseamento de ureia pelo biossensor	40
2.3.10 Performance do Biossensor para a ureia no vinho	40
2.3.11 Performance do Biossensor para a ureia no leite	41
2.3.12 Regeneração do biossensor	41
2.3.13 Estabilidade do biossensor	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:	43
3.1 CRESCIMENTO BACTERIANO:	43
3.1.1 Curva de crescimento da estirpe L10 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em Batch:	43
3.1.2 Tempo de duplicação (t_d) e taxa específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$):	43
3.2 EXPERIÊNCIAS PRELIMINARES PARA A DETERMINAÇÃO DE UREIA NO LEITE E EM TAMPÃO TME:	44
3.2.1 Calibração do eléctrodo:	44
3.2.2 Efeito da presença de ureia na resposta do eléctrodo:	45
3.2.3 Comportamento da resposta do eléctrodo na presença e na ausência de ureia:	46
3.3 OPTIMIZAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR:	47
3.3.1 Recta de calibração:	47
3.3.2 Escolha da concentração de Substrato:	48
3.3.3 Optimização das condições de imobilização:	49
3.3.3.1 Optimização da concentração de glutaraldeído:	50
3.3.3.2 Optimização da quantidade de gelatina:	51
3.3.3.3 Optimização da quantidade de enzima:	53
3.3.3.4 Design Experimental:	55
3.3.4 Optimização de algumas condições de ensaio	58

3.3.4.1 <i>Optimização do pH</i>	58
3.3.4.2 <i>Optimização do tempo de incubação em ureia</i>	60
3.3.5 Características analíticas do biossensor	63
3.3.5.1 <i>Curva de calibração para a ureia no vinho</i>	63
3.3.5.2 <i>Zona linear da curva de calibração</i>	64
3.3.5.3 <i>Sensibilidade</i>	64
3.3.5.4 <i>Tempo de resposta</i>	65
3.3.5.5 <i>Limite de detecção</i>	65
3.3.5.6 <i>Estudo da estabilidade do biossensor</i>	65
3.3.6 Estudo da regeneração do biossensor	66
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS:	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ISE	Ion Selective electrode
FET	Field effect transistor
ISFET	Ion selective field effect transistor
Lys	Lysina
Arg	Arginina
His	Histidina
Tyr	Tyrosina
Trp	Triptona
Rpm	 rotações por minuto
EC	Ethyl carbamate
DNA	Desoxyribonucleic acid
UB	Unidades de biossensor

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

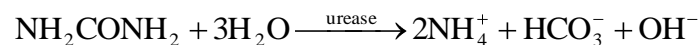
1. INTRODUÇÃO:

1.1 UREIA:

Métodos analíticos económicos, rápidos e de confiança são cada vez mais necessários na indústria alimentar com vista à determinação de substâncias específicas nos alimentos e produtos alimentares. Esta necessidade é devido às normas regulamentares cada vez mais exigentes e às preocupações do consumidor sobre a composição de alimentos e a sua segurança [Luong *et al.*, 1997]. Assim, o processamento de alimentos e bebidas necessitam de técnicas rápidas e acessíveis em termos económicos para o controlo de qualidade de produtos alimentares. O crescente aumento de métodos analíticos “on-line” na indústria alimentar tem estimulado na última década uma procura constante de técnicas analíticas práticas e os biossensores são fortes candidatos para o efeito [Eshkenazi *et al.*, 2000].

A ureia é uma substância largamente distribuída na natureza sendo monitorizada para várias aplicações nomeadamente sobre a saúde humana, animal, agricultura e outras. Esta substância é o produto final do metabolismo das proteínas e a sua detecção e quantificação tem atraído considerável interesse, em particular em análises clínicas, indústria agro-alimentar, monitorização ambiental bem como noutras aplicações a nível industrial e ambiental. [Chou *et al.*, 2008] A crescente acção regulatória nas indústrias alimentar e de bebidas, com a imposição de regras de qualidade cada vez mais exigentes, criam a necessidade de métodos rápidos, efectivos e económicos, como os biossensores, para o controlo da qualidade dos seus produtos.

A urease (EC 3.5.1.5) é uma enzima que está presente na maioria dos sistemas biológicos desempenhando um papel muito importante porque catalisa a decomposição da ureia a seguir discriminada:



Os vinhos e outras bebidas fermentadas e destiladas podem apresentar nalgumas situações níveis elevados de ureia. De acordo com Ough *et al* [Ough, *et al.* 1989] e Francis [Francis, 2006], as vinhas fortemente fertilizadas são provavelmente a principal causa de elevados níveis de ureia nos vinhos. Contudo, a ureia é também sintetizada no

metabolismo de leveduras que fazem parte integrante do fabrico do vinho [Monteiro e Bisson **1991**]. Assim, estudos científicos já indicaram que a arginina e a citrulina são os principais precursores de ureia sendo a estirpe de levedura e temperaturas de fermentação factores que também afectam o aumento da acumulação de ureia nos vinhos [Almy e Ough, **1989**]. A presença da ureia nas bebidas alcoólicas era pouco preocupante até há alguns anos quando se detectou que ela reagia com etanol a altas temperaturas formando carbamato de etilo (*Ethyl Carbamate - EC*). A preocupação com EC é baseada no facto de que testes de toxicidade *in vivo* e *in vitro* demonstraram que este composto é genotóxico ligando-se ao DNA sendo por conseguinte uma substância carcinogénica nos animais [Schlatter e Lutz, **1990**; Zimmerli e Schlatter, **1991**]. Uma vez que a exposição humana aos compostos carcinogénicos deve ser a mais baixa possível, os níveis limites legais de EC nas bebidas alcoólicas e noutros produtos foram estabelecidos nomeadamente no Canadá (até 150µg/L nas bebidas brancas) ao passo que na Califórnia é de 0,7µg/dia [Matsudo *et al.*, **1993**]. Por conseguinte, há um grande interesse na compreensão dos mecanismos envolvidos na formação de EC nas bebidas alcoólicas de forma a intervir no processo de fabrico com vista à redução de níveis de EC de acordo com a legislação em vigor. A formação de EC nos vinhos é bem conhecida uma vez que a ureia, citrulina e carbamil fosfato produzem EC com etanol embora a ureia seja o precursor primário e o melhor indicador da formação potencial de EC [Butzke e Bisson; Hasnip, *et al.*, **2004**]. Por outro lado, a ureia é largamente quantificada no leite de vacas e cabras para melhorar a compreensão do balanço de azoto nos animais. Elevadas concentrações de ureia são frequentemente associadas aos níveis excessivos de proteína **usados** na alimentação de animais [DePeters e Ferguson, **1992**; Kirchgessner *et al.*, **1986**; Kirchgessner e Kaufmann, **1987**]. A ureia não sendo um constituinte natural do leite pode encontra-se presente como um adulterante. A sua presença no leite do gado leiteiro pode estar relacionada com o consumo excessivo de azoto [Verma *et al.*, **2003**]. Este excesso de proteína nas rações de animais representa um custo adicional para os agricultores e o aumento de azoto excretado irá aumentar significativamente a poluição do meio ambiente [Hof *et al.*, **1997**; James *et al.*, **1999**; Jonker *et al.*, **1998**; Kauffman e St- Pierre, **1999**; Schepers e Meijer, **1998**]. Por outro lado, estudos anteriores sugeriam que elevados níveis de ureia no organismo afectavam de forma adversa o desempenho do sistema reprodutivo das vacas [Butler *et al.*, **1996**; Larson *et al.*, **1997**]. Assim, a monitorização da ureia no

leite tornou-se um método vulgar na Europa e nos Estados Unidos de forma a assegurar que o gado leiteiro seja alimentado com uma ração equilibrada de proteínas evitando encargos adicionais e a excessiva poluição ambiental. Os valores típicos de ureia no leite do gado leiteiro saudável variam na gama de 3 a 5 mM [Jonker *et al.*, 1998; Kohn, 2000]. Assim, há uma necessidade premente da análise da ureia no leite do gado leiteiro em tempo real de forma a diagnosticar rapidamente os problemas nutricionais reduzindo desta forma os encargos e erros associados na recolha de amostras, armazenamento, transporte e análise da ureia *in situ*.

1.2 BIOSSENSORES:

Um sensor é um pequeno detector analítico que permite a medição directa de analitos na matriz de uma amostra e este dispositivo deverá ser capaz de responder contínua e reversivelmente ao analito, sem perturbar a amostra sob investigação [Lojou *et al.*, 2006]. As técnicas analíticas químicas e biológicas tradicionais envolvem reacções que ocorrem em solução através da mistura dos reagentes. Um biossensor refere-se a um dispositivo em que o componente biológico está imobilizado no sistema e a reacção ocorre à superfície de um eléctrodo [Chaubey *et al.*, 2002].

Por definição, os biossensores são dispositivos que englobam um elemento de transdução (eléctrodo sensor) coberto por uma camada de reconhecimento bioactiva (enzima, anticorpo, ácido nucleico, parte da estrutura de uma molécula biológica ou microrganismo) que constitui uma interface entre o analito e o eléctrodo sensor. Esta interface é responsável pela regulação da especificidade e sensibilidade do dispositivo, pois é capaz de reconhecer os seus analitos específicos. Sendo permeável e selectiva ao analito alvo, interage especificamente com este, quer directamente, quer através de um mediador. Da interacção do bioelemento com o analito resulta uma reacção cujo produto é selectivamente detectado e quantificado pelo dispositivo sensor. O elemento biológico poderá converter o analito noutra espécie química através de uma reacção bioquímica, produzir ou libertar outro produto químico como resposta ao estímulo do analito, alterar as suas propriedades ópticas, eléctricas ou mecânicas ou produzir qualquer outra resposta que possa ser quantificada. O transdutor tem como função principal a conversão da alteração físico-química no material biologicamente activo, resultante da interacção com

o analito, num sinal electrónico que pode ser adequadamente processado fornecendo um sinal de “output” [Lojou *et al*, 2006; Chaubey *et al* 2001; Buerk, 1993]

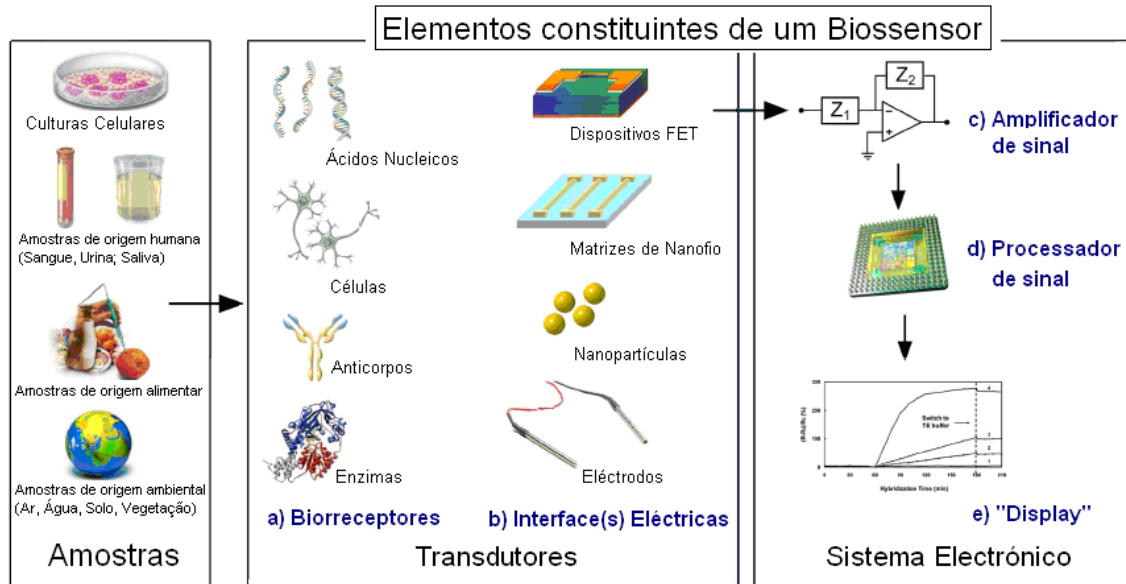


Fig.1 – Elementos constituintes de um Biossensor.

Das várias vantagens da utilização de biossensores realça-se o baixo custo, rapidez, simplicidade de operação e possibilidade de análise em tempo real.

Os biossensores são altamente selectivos não só devido à elevada especificidade do elemento biológico para o reagente alvo, como também devido à elevada selectividade da superfície do eléctrodo aos produtos reaccionais alvo.

Este tipo de dispositivos apresenta uma vasta gama de aplicações importantes em análises clínicas, industriais, ambientais e na agricultura.

O campo de acção dos biossensores é interdisciplinar e os avanços ocorrem pelo progresso em diversas disciplinas tais como a microelectrónica, microcomputadores e biotecnologia. As novas tecnologias de transdutores, a existência de diversos métodos de medição e a utilização de uma vasta gama de sistemas biológicos e bioquímicos têm proporcionado grandemente a expansão das áreas de investigação relacionadas com biossensores [Lojou e Bianco; 2006].

1.2.1 Características de um biossensor ideal:

O “design” óptimo de um biossensor seja este electroquímico, óptico, ou outro tipo de biossensor é ditado por diversas propriedades físicas básicas do sistema de medida, tais

como do meio no qual a medição é feita. Algumas das propriedades mais pertinentes e características de um biossensor ideal são:

1.2.1.1 Sensibilidade:

A sensibilidade é definida como a alteração na magnitude do sinal de “output” do biossensor como resposta à alteração da concentração de uma espécie química específica ($\Delta S/\Delta C$). Muito frequentemente acontece que alterações na concentração de um co-reagente ou de um co-produto de uma reacção química são medidos. A sensibilidade do biossensor no que diz respeito ao substrato de interesse (o analito) deverá posteriormente ser relacionada directamente com as espécies químicas detectadas através de estequiometria adequada. Noutros casos, algumas propriedades físicas são alteradas pelo bio-elemento sendo posteriormente medidas pelo transdutor.

Para alguns biossensores, as medições são baseadas na resposta dinâmica do biossensor. Nestes casos a sensibilidade pode ser definida como a variação no sinal com o tempo para uma dada variação na concentração ($\Delta S/\Delta t\Delta C$) ou qualquer outra relação que dependa do tempo. São diversos os factores que afectam a sensibilidade efectiva de determinado biossensor que incluem o tamanho do sensor, a espessura da membrana e o resultante transporte de massa das espécies químicas da amostra para a região sensora, bem como de diversos processos que desactivam o biossensor. Idealmente, a sensibilidade de um dado biossensor deverá manter-se constante durante o seu tempo de vida e deverá ser suficientemente alta de modo a permitir medições convenientes do sinal de “output” do transdutor com aparelhagem electrónica

1.2.1.2 Linearidade:

Um biossensor perfeitamente linear apresentará a sua sensibilidade constante desde a concentração nula de substrato até à máxima concentração de substrato que possa ser fisicamente dissolvida no meio de medida. Na prática, a região de linearidade é normalmente restrita a um determinado intervalo de concentrações de substrato. Um biossensor não tem necessariamente que ser linear para apresentar aplicabilidade prática desde que a curva de calibração possa ser obtida com precisão suficiente de modo a permitir a interpretação do sinal do biossensor. [Buerk, 1993]

1.2.1.3 Limite de detecção:

Idealmente, a menor quantidade de substrato que pode ser detectada deverá ser apenas limitada pela resolução da instrumentação electrónica utilizada para as medidas. Na prática, são diversos os factores que conduzem a um limite de detecção mais elevado do que aquele que seria de desejar. Como exemplo disto, existem os transdutores electroquímicos baseados em medições potenciométricas que podem apresentar interferências de outros iões bem como reacções de superfície que podem limitar a medição. Obviamente que a concentração de analito a ser determinada deverá encontrar-se dentro do limite de detecção do biossensor de modo a que este tenha utilidade [Buerk, 1993]

1.2.1.4 Selectividade:

Um biossensor ideal deverá responder unicamente a alterações na concentração do analito alvo não sendo assim influenciado pela presença de outra espécies químicas em solução. De outro modo, as leituras obtidas não serão correctas uma vez que a alteração da concentração das espécies interferentes está também a ser tida em consideração. Caso não seja possível eliminar as espécies interferentes da solução torna-se necessário medir estas com outro método de análise de modo a corrigir o sinal do biossensor para a solução alvo. O pH pode também influenciar a reacção química que tem lugar com o bio-elemento do biossensor alterando a sua selectividade .[Buerk, 1993]

1.2.1.5 Tempo de vida:

O elemento biológico utilizado no sistema é normalmente o componente mais instável. Uma importante propriedade do biossensor é o tempo que estes permanecem sensíveis sob condições de operação normais. O tempo de vida pode ser dependente do número total de medições realizadas ou podem depender da magnitude das concentrações de analito medidas, ao passo que as concentrações mais altas podem conduzir a perdas mais rápidas na sensibilidade. Podem ainda existir outras espécies na solução de analito que conduzam a um aceleração do processo de desactivação independentemente da concentração de analito. Outra propriedade importante é o tempo que um biossensor pode ser armazenado entre cada utilização. O armazenamento do biossensor deverá também

ser tido em conta dado que é essencial que se providenciem condições que permitam a manutenção das propriedades bio-activas [Buerk, 1993].

1.2.1.6 Histerese:

Um biossensor ideal não deverá ser afectado pelas medições anteriores. No entanto, quaisquer alterações que se observem no ambiente de medida poderão interferir nos resultados das leituras subsequentes. Uma das situações mais comuns é a difusão do analito quando se encontra em altas concentrações para o interior do biossensor. Este analito acumulado poderá, numa medição subsequente para concentrações mais baixas difundir-se novamente para a solução de analito misturando-se homogeneamente com esta alterando a sua concentração. Para volume baixos este efeito poderá conduzir a erros de leitura [Buerk, 1993]

1.2.1.7 Resposta Dinâmica:

As propriedades físicas e o tamanho relativo do biossensor determinam a velocidade com que este responde às alterações de concentração do analito alvo. Geralmente, o mecanismo principal é usualmente a difusão simples das espécies químicas da amostra até à superfície activa do transdutor. O fluxo de massa do analito alvo e/ou dos reagentes que está a ser detectada é proporcional às diferenças de concentração, aos coeficientes de difusão efectiva para cada espécie que se move através dos diversos elementos do biossensor (membrana, electrólito, e outras estruturas), e à espessura de cada elemento. Normalmente, este tipo de resposta é referente a processos dependentes da difusão.[Buerk, 1993]

1.2.2 Classificação:

Os biossensores são classificados de acordo com o tipo de transdutor que é utilizado e assim subdividem-se em biossensores ópticos, calorimétricos, piezoelectrónicos, electroquímicos e transístores de efeito de campo (“Field effect transistors” – FET) [Chaubey e Malhotra, 2002; Singh *et al* 2008]:

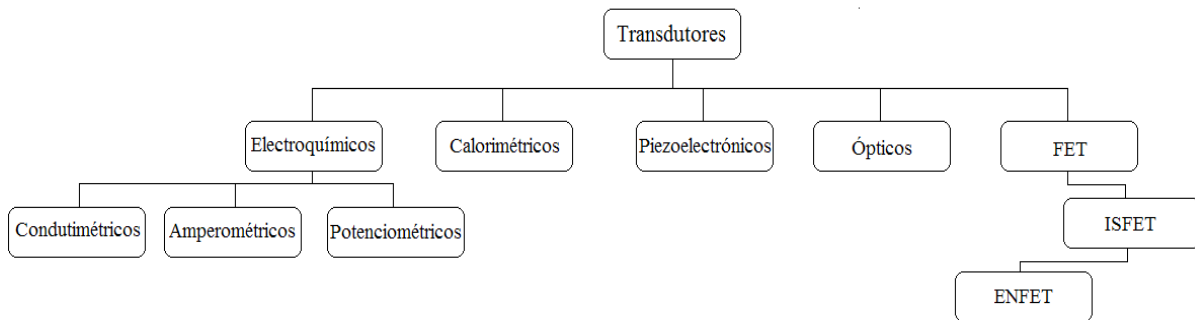


Fig.2 – Classificação de Transdutores. Adaptado de Singh *et al* 2008.

1.2.2.1 Biossensores Electroquímicos:

Os sensores electroquímicos representam uma importante subclasse de sensores químicos nos quais um eléctrodo é utilizado como elemento transdutor. O objectivo é gerar um sinal eléctrico que esteja de algum modo relacionado com a concentração de analito. Neste tipo de biossensores [Janata *et al.*, 1998] a capacidade analítica das técnicas electroquímicas é combinada com a especificidade do processo de reconhecimento biológico. Nesta configuração um agente bio-específico é imobilizado à superfície de um eléctrodo, o qual converte o processo de reconhecimento biológico numa resposta amperométrica ou potenciométrica quantificável. A selectividade do biossensor é providenciada pela imobilização de um elemento biológico sensível e selectivo (tipicamente uma enzima) em contacto próximo com o sensor [Janata *et al.*, 1998]. São os biossensores mais utilizados, não apresentando as desvantagens que inibem a utilização dos restantes tipos de biossensores sendo rápidos, fáceis de manusear e de baixo custo e são classificados em função do modo de detecção [Chaubey e Malhotra, 2001]

1.2.1.1 Biossensores Conduvimétricos:

Medem as alterações na condutância entre um par de eléctrodos metálicos como consequência da acção do elemento biológico. [Sukeerthi e Contractor, 1994]

1.2.1.2 Biossensores Amperométricos:

Medem as alterações na corrente do eléctrodo de trabalho devido à oxidação directa dos produtos de uma reacção biológica. Estes biossensores podem ainda basear-se em sistemas directos ou indirectos. Os primeiros envolvem uma reacção redox biológica, implicando a utilização de eléctrodos modificados usualmente um aceitador de electrões

no lugar de um dador de electrões natural, já os sistemas indirectos exploram os detectores convencionais para medirem o substrato metabólico ou o produto. Podem também implicar o envolvimento de um mediador para a reacção electroquímica. Mediadores são agentes artificiais de transferência de electrões que participam na reacção redox com o componente biológico e auxiliam na transferência de electrões [Chaubey e Malhotra; 2001].

1.2.1.3 Biossensores Potenciométricos:

Estes baseiam-se na medição dos potenciais do eléctrodo de trabalho em relação a um eléctrodo de referência [Chaubey e Malhotra, 2001].

1.2.1.3.1 Eléctrodo selectivo de iões amónio:

Os eléctrodos selectivos de iões (ISE) são um exemplo típico de sensores químicos que utilizam o princípio da química de reconhecimento molecular. Estes são preparados pela imobilização de moléculas capazes de reconhecer uma classe específica de espécies iónicas numa matriz polimérica apropriada. Esta matriz é depois montada no corpo do eléctrodo composto por um fio de Ag/AgCl e uma solução interna. A performance analítica dos ISE's depende grandemente da qualidade do ionoforo incorporado nas membranas poliméricas, apesar disso o tipo e composição relativa de todos os componentes utilizados para a construção da membrana variam grandemente as suas propriedades electroanalíticas [Shim *Et al*, 2004]. Nos ISE's os iões alvo presentes em matrizes biológicas complexas são quantificados devido à detecção de alterações no potencial do eléctrodo provocadas pela ligação selectiva dos iões à superfície do eléctrodo [Chaubey e Malhotra, 2001]. No caso específico do eléctrodo selectivo de iões amónio possui uma membrana sólida constituída por uma matriz polimérica em PVC que é específica para os iões amónio presentes em solução aquosa sendo condutora destes iões. Tratando-se de um método potenciométrico de análise exige a presença de um eléctrodo de referência. Este é um eléctrodo de junção dupla cujo revestimento interno deve ser constituído por uma substância que não interfira com a análise, ou seja, que não possua iões que sejam detectados pelo eléctrodo selectivo de iões interferindo assim com a sua detecção. No presente caso, o revestimento interno do eléctrodo de referência contem acetato de lítio. Basicamente, este método permite correlacionar um potencial

lido em mV e a concentração respectiva de iões amónio presentes em solução, o que é possível através da construção prévia de uma recta de calibração com recurso a padrões de concentração conhecida de NH_4Cl .

1.2.2.2 Biossensores ópticos:

São baseados na medição da luz absorvida ou emitida como consequência de uma reacção bioquímica. Neste tipo de biossensores a luz é conduzida por meio de fibras ópticas até ao detector [Peterson e Vurek, 1984; Seitz, 1987]. São bastante sensíveis, no entanto, não podem ser utilizados em meios turvos.

1.2.2.3 Biossensores Calorimétricos:

Detectam o analito com base no calor envolvido na reacção química originada pela interacção deste com o elemento bioactivo. Não podem ser utilizados em sistemas que apresentem trocas de calor muito baixas [Chaubey e Malhotra, 2002].

1.2.2.4 Biossensores Piezoelectrónicos:

Operam com base no princípio da geração de dipolos eléctricos ao submeter um cristal natural anisotrópico a stress mecânico. A adsorção do analito aumenta a massa do cristal e altera a sua frequência de oscilação básica [Abad *et al.*, 1998; Minunni *et al.*, 1994].

1.3 BIOSSENSORES BASEADOS NA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA:

Os biossensores tornaram-se uma importante ferramenta para a detecção de componentes biológicos e químicos na monitorização clínica, alimentar e ambiental. Os motivos enunciados para este sucesso recaem sobre as suas excepcionais capacidades de performance que incluem elevada especificidade e sensibilidade, resposta rápida, baixo custo, tamanho relativamente pequeno e facilidade de operação.

Enquanto os transdutores electroquímicos combinados com uma enzima constituindo o elemento bioquímico formam a maior categoria os sistemas de biossensores que dependem especificamente da inibição podem ser divididos em três categorias [Amine, *et al.*, 2006]:

Biossensores baseados na imobilização de células intactas: Podem conduzir ao aumento da estabilidade do biossensor e facilitar a regeneração da enzima. Estes podem no entanto sofrer reacções paralelas indesejáveis devido à coexistência de diversas enzimas [Amine, *et al.*, 2006].

Dispositivos sensores associados a reactores que contenham uma matriz de enzima imobilizada: o inibidor passa através do reactor e inibe a enzima. A actividade residual da enzima é avaliada medindo a quantidade de produto enzimático que esta catalisa antes e após a sua inibição [Amine, *et al.*, 2006].

Biossensores baseados na imobilização directa da enzima no dispositivo transdutor: a enzima e o transdutor encontram-se em contacto íntimo incorporando uma unidade única [Amine, *et al.*, 2006].

Os biossensores baseados em mecanismos inibitórios foram já utilizados na análise de uma elevada multiplicidade de analitos significativamente importantes tais como pesticidas organofosforados, organoclorados, derivados de insecticidas, metais pesados e glicocalcoides. A selecção do sistema enzima/analito é baseada no facto de que estes analitos tóxicos inibem a normal função de catálise da enzima. De um modo geral, o desenvolvimento destes sistemas de biossensores baseia-se numa medição quantitativa da actividade enzimática antes e após a exposição a um analito alvo. Tipicamente a percentagem de enzima inibida (I%) resultante da exposição ao analito encontra-se quantitativamente relacionada com a concentração do elemento inibidor (que se encontra no analito) e com o tempo de inibição. Consequentemente, a actividade da enzima residual é inversamente proporcional à concentração do elemento inibidor

1.3.1 Princípio de funcionamento de um biossensor baseado na inibição enzimática:

Os biossensores são elementos analíticos que combinam um elemento de bio reconhecimento e um transdutor físico para a detecção dos componentes alvo. Nos biossensores baseados em enzimas o elemento biológico é a enzima que reage selectivamente com o seu substrato. É já sabido que a resposta de um biossensor à adição de um substrato é determinada pela concentração do produto (P) da reacção enzimática na

superfície do sensor. A reacção é controlada pela velocidade de dois processos simultâneos, a conversão enzimática do substrato (S) e a difusão do produto da camada enzimática. Dado que os compostos poluentes inibem selectivamente a actividade de certas enzimas, a sua actividade e a concentração do produto resultante são afectadas. Esta inibição é analiticamente útil e é utilizada vantajosamente para a construção de diversos dispositivos de biossensores [Amine, *et al.*, 2006].

1.3.2 Imobilização enzimática:

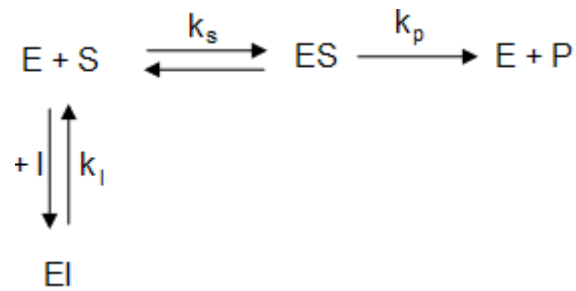
O desenvolvimento de biossensores baseados na imobilização enzimática permitiu resolver diversas limitações tais como a perda de enzima (por vezes dispendiosa), manutenção da estabilidade da enzima, aumento do tempo de meia vida do biossensor e adicionalmente a redução do tempo de resposta. São conhecidas diversas técnicas de imobilização, estas incluem encapsulamento físico, microencapsulação, adsorção, ligação covalente e ligação cruzada covalente. Diversos autores confirmam que a performance de um dispositivo biossensor está fortemente dependente da sua configuração. A imobilização da enzima é um dos passos mais importantes envolvidos no “design” do biossensor. A escolha da técnica utilizada para ligar o componente biológico (enzima) ao transdutor é crucial, dado que a estabilidade, tempo de vida e sensibilidade dependem grandemente da configuração da camada enzimática [Amine, *et al.*, 2006].

1.3.3 Sistema Enzima/Inibidor:

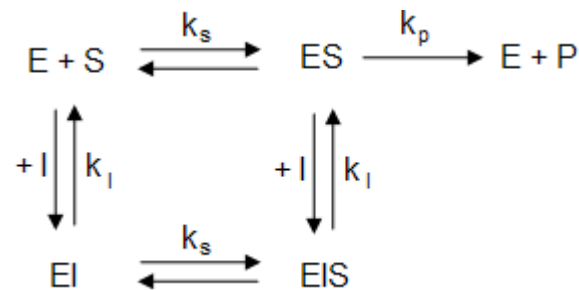
A reacção enzima/inibidor é muitas vezes complexa [Amine, *et al.*, 2006]. Existem diversos mecanismos que resultam da interacção entre a enzima e o composto a analisar. Assim podemos referir dois tipos de inibição:

1.3.3.1 Inibição Reversível:

O tempo de vida de um biossensor enzimático pode ser severamente restrita pelos diversos inibidores a serem medidos. A inibição pode ser reversível ou ser resultante da inactivação irreversível da enzima. Inibidores estruturalmente relacionados com o substrato podem ligar-se ao centro activo da enzima e competir com este (inibição competitiva):

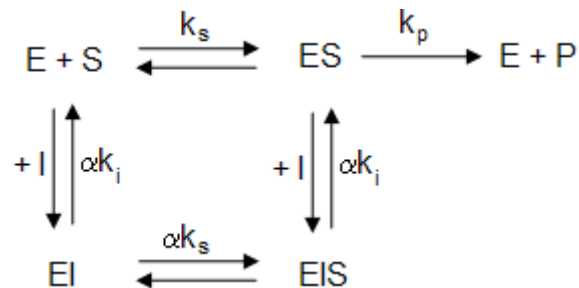


Se o inibidor não se ligar somente à enzima mas também ao complexa enzima-substrato, o centro activo perde a sua conformação e conseqüentemente perde também a sua função catalítica. Neste caso, o substrato e o inibidor não competem entre si (inibição não competitiva):



Inibidores competitivos e não competitivos afectam diferentemente a cinética enzimática [Segel, 1976]. Um inibidor competitivo não altera a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) mas aumenta a constante de Michaelis-Menten (K_M) por outro lado uma inibição não competitiva resulta na manutenção de K_M e no decréscimo de $V_{m\acute{a}x}$.

Pode ainda ocorrer inibição mista. Neste tipo de inibição o inibidor liga-se à enzima e ao complexa enzima-substrato mas com diferentes afinidades para cada um deles:



Na inibição não competitiva o inibidor liga-se somente quando o complexa enzima-substrato se forma:

difusão o modelo prevê que a percentagem de inibição da enzima (%), após exposição ao inibidor, está linearmente relacionada com a concentração de inibidor [I] e a raiz quadrada do tempo de incubação ($t^{1/2}$). [Zhang *et al.*, 2001; Amine, *et al.*, 2006]

1.3.4 Limite de Detecção:

A determinação do efeito inibitório inclui os seguintes passos: determinação da actividade enzimática inicial, a incubação do biossensor numa solução que contenha um inibidor, e finalmente a medição da actividade residual, que é a actividade após exposição ao inibidor. O limite de detecção define-se como a concentração da espécie a ser medida que forneça a mínima diferença detectável (redução da actividade) que é igual a 2 ou 3 vezes o desvio padrão da resposta média do branco (concentração de inibidor nula), no entanto esta metodologia não tem em consideração o intervalo de confiança do inibidor. O verdadeiro valor do limite de detecção pode ser definido como a concentração de inibidor para a qual o intervalo de confiança não ultrapasse o intervalo de confiança obtido para concentração zero de inibidor. Qualquer concentração acima do limite mínimo de detecção possui 95% (2 desvios padrões) ou 99% (3 desvios padrões) de probabilidades de ser um resultado real [Amine, *et al.*, 2006].

O limite de detecção corresponde geralmente a 90-80% da actividade residual ou seja 10-20% de inibição. O limite de detecção depende do tempo de incubação da enzima com o inibidor e o grau de inibição enzimática aumenta com o tempo de incubação até atingir uma patamar estável. O limite de detecção de diversos biossensores depende de diversos parâmetros tais como pH, temperatura, quantidade de enzima (no caso de inibição irreversível), da concentração de substrato (no caso de inibição competitiva reversível), da matriz da imobilização e do tempo de reacção entre a enzima e o inibidor [Amine, *et al.*, 2006].

1.3.5 Regeneração:

Compreender o mecanismo de inibição e de regeneração das enzimas é um problema geral de grande importância para muitos bioquímicos e biotecnólogos, especialmente quando se utilizam enzimas imobilizadas. A forte inibição da enzima pode constituir um problema sério em termos práticos pois limita a reutilização do biossensor. Deste modo

torna-se necessário estudar a possibilidade de reactivação da enzima que se pretende tanto mais alta quanto possível [Amine, *et al.*, 2006].

Vários estudos demonstraram que o tempo que decorre entre a inibição e a reactivação influencia de forma indirecta a percentagem de reactivação, ou seja quanto maior for o tempo decorrido entre o contacto da enzima com o inibidor menor é a percentagem de reactivação conseguida. O tempo de contacto da enzima com o agente inibidor também influencia a possibilidade de reactivação da enzima, sendo esta tanto menor quanto maior for o tempo de incubação [Amine, *et al.*, 2006].

1.3.6. Parâmetros que afectam a performance do biossensor:

1.3.6.1 Efeito do pH:

O pH das soluções contendo substratos pode afectar a actividade enzimática uma vez que, tal como todas as proteínas as enzimas possuem uma estrutura terciária nativa que é sensível ao pH, a desnaturação das enzimas pode ocorrer a valores de pH extremos. É bem sabido que a actividade da enzima é altamente dependente do pH deste modo o pH óptimo para um ensaio enzimático deve ser determinado empiricamente. O pH óptimo deverá situar-se num patamar de modo que o pH não interfira grandemente na actividade da enzima e que não interfira com os resultados obtidos relativos à inibição da enzima pelo inibidor.

1.3.6.2 Efeito da concentração de substrato:

A resposta do biossensor para o substrato é determinada pela concentração de produto da reacção enzimática à superfície do sensor. A concentração de substrato pode influenciar o grau de inibição [Kok *et al.*, 2002]. Para baixas concentrações de substrato, o efeito inibitório, qualquer que seja o inibidor utilizado, é menor dado que a enzima na membrana se encontra em excesso e somente parte da enzima está envolvida na conversão do substrato, ou seja a enzima em excesso não toma parte na reacção. Neste caso as moléculas de enzima ligadas ao inibidor podem ser compensadas pelas moléculas de enzima livre presentes na membrana. Como resultado, o decréscimo da resposta do biossensor não fornecerá uma indicação correcta da quantidade de enzima realmente inibida na presença do agente inibidor. Este efeito é típico para enzimas imobilizadas

qualquer que seja o mecanismo de inibição ou o sistema utilizado para a detecção de actividade enzimática [Amine, *et al.*, 2006]. Para concentrações de substrato elevadas, a situação é bastante diferente, e depende do tipo de inibidor. No caso de inibição reversível, tanto o substrato como o inibidor interagem simultaneamente com a enzima imobilizada e a sensibilidade ao inibidor decresce com o aumento da concentração de substrato. Tal comportamento observa-se somente quando estamos perante inibição reversível. No caso de inibição irreversível, para concentrações saturantes de substrato, todas as moléculas de enzima presentes na membrana estão envolvidas na reacção enzimática. Se parte destas moléculas se encontrar ligada ao inibidor, a resposta do biossensor decresce. Este comportamento é somente observado no mecanismo irreversível de inibição. [Dzyadevych *et al.*, 2004].

1.3.6.3 Efeito da concentração de enzima:

A reacção enzimática é controlada pela velocidade de dois processos simultâneos, a conversão do substrato (S) e a difusão do produto da camada enzimática. Se existir uma elevada actividade enzimática, o decréscimo na concentração de substrato não será totalmente compensado pela transferência da solução através da membrana devido a limitações difusionais, e por este motivo, apenas uma fracção dos centros activos enzimáticos estará envolvida na interacção com o substrato. Neste caso, controlo difusional da resposta, a sensibilidade da enzima imobilizada à inactivação, quer por efeito da temperatura ou presença de um inibidor, será menor quando comparada com a enzima em solução [Amine *et al.*, 2006].

A maior sensibilidade a inibidores foi determinada para concentrações mais baixas de enzima. [Shan *et al.*, 2004; Mohammadi *et al.*, 2005; Sotiropolou e Chaniotakis, 2005; Sotiropoulou *et al.*, 2005].

1.4. DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO EM FASES ORGÂNICAS:

A determinação de inibidores (pesticidas e metais pesados) é normalmente realizada em soluções aquosas. No entanto, estes compostos são geralmente caracterizados pela sua baixa solubilidade em água e pela sua elevada solubilidade em solventes orgânicos e deste modo a extracção e concentração de pesticidas ou de metais pesados de matrizes sólidas (vegetais, frutas, peixe) são vulgarmente efectuadas nesses solventes.

Dependendo da natureza e da quantidade dos solventes orgânicos envolvidos, a enzima poderá ser fortemente inactivada quando as experiências são desenvolvidas nestes meios [Amine *et al.*, 2004]. Assim, a escolha do solvente deverá ser considerada como parte do desenvolvimento do método de modo a evitar efeitos indesejáveis. Os efeitos de solventes orgânicos são bastante variáveis e dependem da configuração na qual a enzima é empregue.

1.5. IMOBILIZAÇÃO:

O objectivo essencial da imobilização enzimática é a restrição da liberdade de movimentos da enzima. A opção pelo método de imobilização e pelo suporte a empregar exige que se tenha em linha de conta algumas considerações fundamentais no que se refere à propriedades físicas (Robustez, ausência de compressão das partículas, área superficial disponível, formato - leitos/membranas/fibras, grau de porosidade, volume dos poros, permeabilidade, densidade, queda de pressão, taxa de fluxo, espaço para biomassa) e químicas (Hidrofilicidade - água que se liga ao suporte, inerte às enzima/células, grupos funcionais disponíveis e regeneração/reutilização do suporte) do suporte, à estabilidade (Armazenamento, actividade residual da enzima, produtividade celular, regeneração da actividade enzimática, manutenção da viabilidade celular e estabilidade mecânica do material de suporte), resistência (Ataque de bactérias ou fungos, pH, temperatura; solventes orgânicos; proteases, mecanismos de defesa celulares), segurança (Biocompatibilidade - invoca uma resposta imunológica; toxicidade dos reagentes; segurança para os operadores de processo e utilizadores finais do produto), custo (Disponibilidade e custo do suporte, reagentes, equipamento especial, competências técnicas necessárias, impacto ambiental, possibilidade de “scale-up” do processo, possibilidade de reutilização do suporte, tempo de vida efectivo) e existência de reacções paralelas (Taxa de fluxo, quantidade de enzima/células e produtividade catalítica, cinética de reacção, reacções laterais indesejáveis, limitações difusionais, transferência de massa, cofactores, substratos e produtos) [Bickerstaff, 1997].

1.5.1 Imobilização por Ligação covalente:

Este método de imobilização envolve a formação de uma ligação covalente entre a enzima/célula e o material do suporte. [Porath e Axén, 1976; Woodward, 1985; Cabral e

Kennedy, 1991]. A ligação é normalmente formada entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais pertencentes aos resíduos amino acídicos na superfície da enzima. Existe uma grande diversidade de grupos funcionais amino acídicos adequados para participar na formação de ligações covalentes. Os grupos mais comuns neste tipo de ligações são os grupos amino (NH₂) da lisina e da arginina, os grupos carboxílicos (CO₂H) do ácido aspártico ou do ácido glutâmico, os grupos hidroxilo (OH) da serina e da treonina e por fim os grupos –SH da cisteína [Srere e Uyeda, 1976].

Existe disponível uma grande variedade de materiais de suporte para a ligação covalente, não podendo nenhum deles ser considerado o ideal. Na verdade, não existe um material de suporte ideal, deste modo as vantagens e desvantagens em utilizar um ou outro material de suporte têm que ser tomadas em consideração na selecção do procedimento a efectuar para determinada imobilização enzimática [White e Kennedy, 1980; Taylor, 1991]. Diversos factores podem influenciar a selecção de um suporte em particular. A capacidade hidrofílica é o factor mais importante para manter a actividade enzimática no ambiente do suporte [Gemeiner, 1992]. Como consequência, os polissacáridos (ex: celulose, dextrano, amido e agarose) são materiais bastante populares para a imobilização enzimática pois são altamente hidrofílicos. Os resíduos de açúcares nestes polímeros contêm grupos hidroxilo, que são grupos funcionais ideais para activação química de modo a proporcionar a formação de ligações covalentes. Os grupos hidroxilo também formam ligações por pontes de hidrogénio com as moléculas de água e deste modo criam um ambiente hidrofílico no suporte. Os suportes constituídos por polissacáridos são susceptíveis à degradação por acção de microrganismos (bactérias ou fungos) sendo os géis ainda mais sensíveis a solventes orgânicos. Existe ainda a sílica e o vidro porosos os quais constituem também meios populares para a imobilização por ligação covalente [Bickerstaff, 1997].

Existem diversos procedimentos reaccionais para acoplar uma enzima a um suporte por meio de uma ligação covalente, nomeadamente a reacção de alquilação, formação de uma ligação peptídica, formação de uma ligação de isoureia ou de uma ligação diazo [Bickerstaff, 1997].

É importante seleccionar um método de imobilização que não conduza à desactivação da enzima devido à reacção com o centro activo desta, directa ou indirectamente. Deste

modo, se uma enzima empregar um grupo carboxílico como centro activo deverá seleccionar-se uma reacção que envolva os grupos amina para a ligação covalente com o material do suporte [Bickerstaff, 1997].

Em primeiro lugar, os grupos funcionais do material que constitui o suporte são activados por um reagente específico, em segundo lugar, a enzima é adicionada numa reacção de acoplamento de modo a formar uma ligação covalente da enzima ao material do suporte. Normalmente, a reacção de activação é feita de modo a tornar os grupos funcionais do suporte fortemente electrofílicos. Na reacção de acoplamento, estes grupos irão reagir com nucleófilos fortes tais como os grupos funcionais amina (-NH₂) de certos amino ácidos à superfície da enzima de modo a formar uma ligação covalente [Bickerstaff, 1997].

O método de imobilização não é restringido pelo tipo de material do suporte utilizado, sendo possível uma grande diversidade de combinações entre métodos de imobilização e o tipo de suporte utilizado. Esta é possível graças à modificação química dos grupos funcionais do material de suporte [Bickerstaff, 1997].

1.5.2 Imobilização por Ligação Covalente Cruzada:

As ligações cruzadas não dizem respeito à imobilização do bioelemento na superfície de um suporte, mas sim à ligação entre células ou enzimas entre si, formando uma estrutura tridimensional complexa de grandes dimensões. As ligações cruzadas podem efectuar-se através de métodos físicos ou químicos. Os métodos químicos envolvem normalmente a formação de ligações co-valentes entre as células por meio da utilização de reagentes bi ou multifuncionais como o glutaraldeído ou o tolueno diisocianato. No entanto a toxicidade destes reagentes é um factor limitante na aplicação deste método a células vivas e a muitas enzimas. Assim, de modo a contornar este problema, moléculas adicionais de proteína que funcionarão como espaçadores poderão ser empregues de modo a minimizar a proximidade das enzimas com o agente “bi” ou multifuncional, usando para o efeito habitualmente gelatina ou albumina.

A ligação cruzada é raramente utilizada sozinha como meio de imobilização, dado que a ausência de propriedades mecânicas e a baixa estabilidade são graves limitações a este processo. Este tipo de ligação é muitas vezes utilizado em conjunto com outros processos

de imobilização de modo a melhorá-los pois permite a redução da desagregação do bioelemento células/enzimas destes sistemas [Bickerstaff, 1997].

A utilização de enzimas imobilizadas em bioprocessos apresenta inúmeras vantagens, incluindo grande produtividade (dado que as mesmas moléculas de enzima podem ser utilizadas por um longo período de tempo), aumento de estabilidade da enzima, maior precisão no controlo da extensão da reacção e ainda, a possibilidade de automação e operação contínua. [Wu *et al.*, 2007].

1.5.2.1 Glutaraldeído:

O glutaraldeído (GA) ou Pentano-1,5-dial segundo a IUPAC, tem sido largamente utilizado em química analítica, química orgânica, química de polímeros e medicina. O glutaraldeído é utilizado na imobilização de moléculas biologicamente activas como proteínas ou enzimas. A principal vantagem que advém da reacção do glutaraldeído com proteínas é a irreversibilidade e estabilidade dos seus produtos numa vasta gama de pH, força iónica e temperatura. Uma vantagem adicional na aplicação do glutaraldeído é o facto de não causar a corrosão de metais e não danificar instrumentos feitos de borracha. A elevada reactividade do glutaraldeído, a sua estrutura em solução aquosa e o mecanismo de reacção com proteínas têm sido alvo de inúmeros estudos. [Brycki *et al.*, 2001]

Cada molécula de glutaraldeído é composta por dois grupos aldeído separados por uma cadeia flexível constituída por três pontes de metileno:

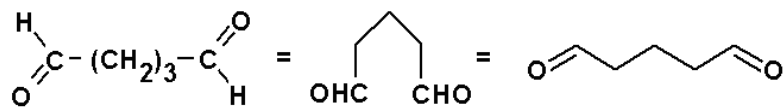


Fig.4: Glutaraldeído

O potencial para a formação de ligações cruzadas é providenciado por ambos os grupos – CHO que intervém em reacções com proteínas em soluções aquosas e a baixas temperaturas.

Comercialmente, o GA encontra-se disponível em soluções aquosas a 2%, 25% e 50% (v/v). Sendo um aldeído altamente reactivo, o GA existe como uma mistura de formas hidratadas e não hidratadas. Deste modo as formas monomérica, mono e di-hidratadas de

cadeia aberta, hemiacetálica cíclica e acetálica polimérica coexistem num equilíbrio complexo. Em condições ácidas, o hemiacetal cíclico e os polímeros acetálicos com comprimento de cadeia variado são as formas predominantes.

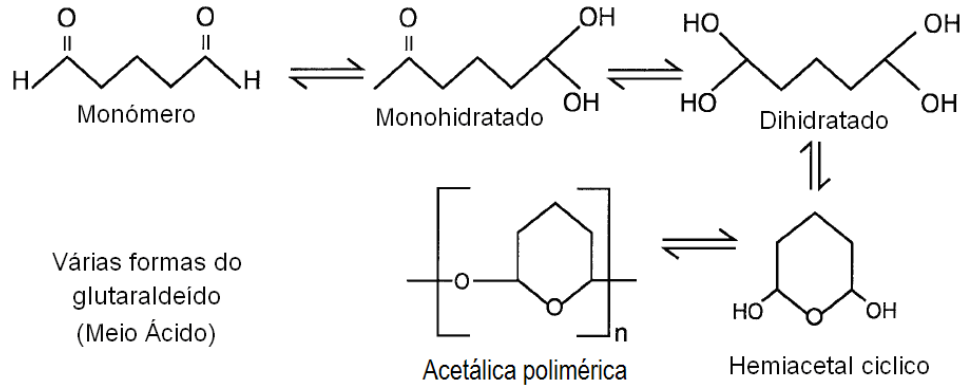


Fig.5: Várias formas do glutaraldeído em meio ácido

Em meios neutros a básicos, o glutaraldeído sofre espontaneamente uma condensação aldólica seguida de uma desidratação dando origem a aldeídos multiméricos α,β -insaturados com vários comprimentos de cadeia com estruturas complexas, que podem reagir com grupos proteicos:

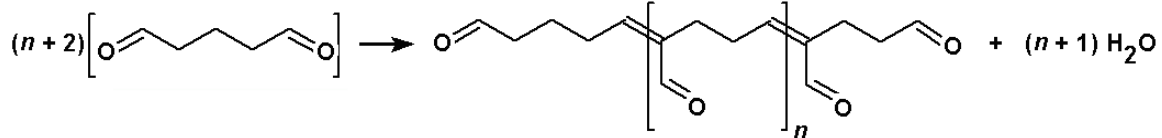


Fig.6: Reacção de polimerização do glutaraldeído, mostrando uma cadeia lateral de aldeído em cada unidade do polímero

Em solução aquosa o glutaraldeído está maioritariamente presente na forma de polímeros de diversos tamanhos. [Monsan *et al.*, 1975]

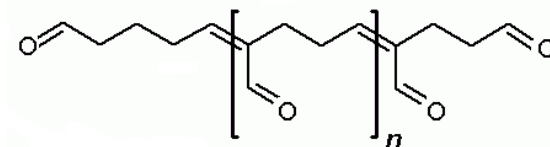


Fig.7: poli(Glutaraldeído): Polímero do tipo aldólico.

Existem grupos aldeído livres em cada unidade da molécula polimérica, bem como nas extremidades da cadeia. Todos estes grupos vão ligar-se com os grupos amina das

proteínas com as quais entram em contacto, possuindo um enorme potencial para a formação de ligações cruzadas:

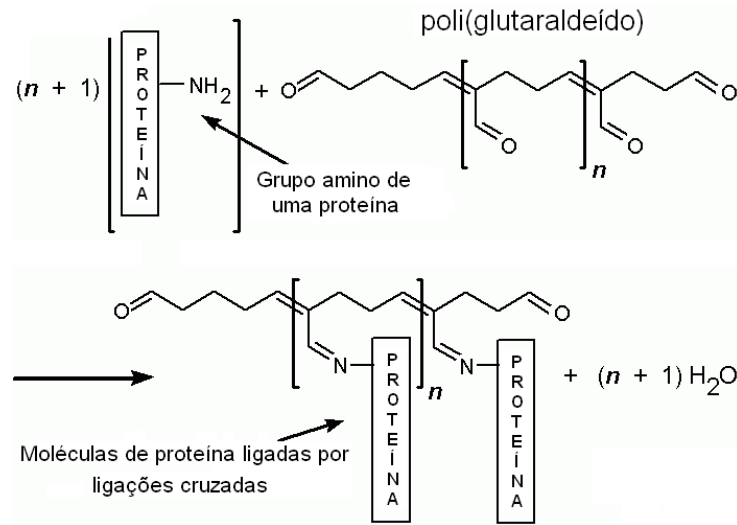


Fig.8: Reacção do poli(glutaraldeído) com os grupos amina de proteínas adaptado de . [Brycki *et al.*, 2001]

Em ambiente alcalino a velocidade da reacção é superior e na reacção com proteínas os polímeros aldólicos do glutaraldeído reagem de modo a formar produtos reaccionais imino α,β -insaturadas que são altamente estabilizados por ressonância e extremamente resistentes à hidrólise ácida e re-hidratação. Os produtos provenientes de reacções do tipo Base de Schiff susceptíveis a hidrólise ácida e rehidratação aparentemente não se formam ou não subsistem durante a reacção. Grupos epsilon-amino (ex:lisina) são particularmente reactivos e estericamente acessíveis ao glutaraldeído. Em adição a análise dos resíduos de lisina apresenta pKa entre 8-8,5 o que aparentemente confirma a formação de aductos de Michael de polímeros aldólicos que são resistentes à hidrólise ácida. A formação de aductos do tipo base de Schiff, os quais apresentam pka's inferiores a 5 ou 6 e susceptibilidade à rehidratação, não se observa com a fixação de proteínas por intermédio do glutaraldeído. [Bedino, 2003]

Em reacção o glutaraldeído forma amino-metióis condensando com outros grupos, tais como fenol, imidazol, indol, tiol ou cisteína formando ligações por pontes. Os grupos mais reactivos são aparentemente grupos amina terminais, grupos α -amino constituintes dos péptidos dos aminoácidos e cisteína por intermédio do terminal SH-, ao passo que o imidazole é menos reactivo. [Bedino, 2003]

A utilização de glutaraldeído e de suportes contendo grupos amina primários é uma das técnicas de imobilização mais frequentemente utilizadas para a imobilização de enzimas por ligação cruzada. Existem diversas formas de utilizar o glutaraldeído para este propósito, tais como a imobilização das enzimas em suportes previamente activados com glutaraldeído ou o tratamento das proteínas adsorvidas em suportes contendo grupos amina primários com glutaraldeído [Betancor *et al.*, Second Edition].

A imobilização enzimática por ligações cruzadas, quando demasiado extensa, pode conduzir à perda ou a uma redução significativa da actividade enzimática devido à possibilidade de impedimento estereoquímico [Sabatini *et al.*, 1962]. Estudos sugerem que o glutaraldeído permite a imobilização das proteínas sem perda extensiva da actividade. [Hopwood *et al.*, 1970] e por conseguinte a quantidade de glutaraldeído a aplicar no processo de imobilização deverá ser optimizada.

1.6 PSEUDOMONAS AERUGINOSA:

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa bastante versátil que cresce no solo, em habitats costeiros marinhos bem como nos tecidos de plantas e animais. Forma biofilmes em superfícies húmidas tais como rochas e solo. É patogénica para o ser humano sendo responsável por infecções em vítimas de queimaduras, infecções do trato urinário ou pneumonia hospitalar. É também a causa predominante de mortalidade em doentes com fibrose quística aproveitando-se desta condição para proliferar nos pulmões destes doentes. A sua elevada resistência a antibióticos e desinfectantes impede a erradicação destas infecções que proliferam de forma galopante provocando a morte a estes pacientes. [Stover *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2003; Garske, 2004; Thomas *et al.*, 2006]

O género *Pseudomonas* apresenta muitas características que o tornam apropriado para a análise genética. As principais vantagens que tornam a *Pseudomonas aeruginosa* uma bactéria privilegiada nos estudos bioquímicos e biológicos combinados são o facto de não ser exigente em termos de crescimento desenvolvendo-se numa grande variedade de meios mesmo em meios pobres. Embora seja um organismo potencialmente patogénico, não apresenta risco patogénico em ambiente de laboratório não exigindo portanto precauções restritas de utilização. A disponibilidade de mutantes existente em tipo e em

número para determinado organismo determinam frequentemente a sua utilidade [Ambler *et al.*, 1987].

A estirpe selvagem de *Pseudomonas aeruginosa* cresce em meios contendo amidas alifáticas de cadeia curta como única fonte de carbono, tais como, acetamida ou propionamida. Esta é capaz de utilizar um vasto leque de compostos orgânicos como fonte de carbono e azoto devido ao facto de possuir um elevado número de enzimas catabólicas. Uma destas enzimas, a amidase alifática (EC 3.5.1.4), permite a utilização de amidas alifáticas simples tais como acetamida e propionamida como únicas fontes de carbono e azoto, pela hidrólise destas a amónia e correspondentes ácidos carboxílicos. A expressão da amidase é induzida pela presença de amidas sendo codificada pelo gene *amiE* que se encontra ligado ao gene *amiR*. [Ambler *et al.*, 1987; Cousens *et al.*, 1987].

Esta bactéria é útil para a degradação de compostos de nitrilo que são utilizados em diversas operações industriais. Muitos destes compostos são altamente tóxicos sendo alguns deles carcinogénicos e mutagénicos [Nawaz *et al.*, 1989]. A biodegradação destes compostos é de elevado interesse dado que alguns são altamente tóxicos sendo mutagénicos, carcinogénicos e teratogénicos [Nawaz e Chapatwala, 1990].

As estirpes mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* produzem amidases com diferentes especificidades de substratos para diversas amidas tais como butiramida ou valeramida. Devido à grande diferença entre estas amidases no que diz respeito a inibidores e substratos específicos, é de grande interesse a purificação destas enzimas a partir das estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* [Domingos *et al.*, 1989; Novo *et al.*, 1995].

1.7 AMIDASE:

1.7.1 Estrutura da amidase:

As nitrilases, uma superfamília de enzimas distribuídas por onze ramos de classificação de acordo com o tipo de reacções que catalisam [Brenner, 2002; Andrade *et al.*, 2007] são enzimas que possuem um grupo tiol e estão envolvidas na degradação de nitrilos, convertendo-os ao ácido carboxílico correspondente e amónia, através de um intermediário tetraédrico, sem a formação intermédia de uma amina. São responsáveis pela biossíntese de produtos naturais e estão envolvidas em modificações pós-tradução. A actividade de nitrilase tem sido reportada em animais, fungos, plantas e alguns procariontes. [Novo *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2007]

A amidase alifática indutível (acilamida amidohidrolase; EC 3.5.1.4) codificada pelo gene *amiE* de *Pseudomonas aeruginosa* é uma enzima homo-hexamérica, com aproximadamente 38 KDa de peso molecular por cada monómero, que catalisa a hidrólise de um pequeno grupo de amidas alifáticas e demonstra uma elevada sensibilidade à inibição através da ureia e da hidroxiiureia. Está presente em diversas espécies bacterianas tais como *Pseudomonas*, *Rhodococcus* e *Klebsiella* [Pacheco *et al.*, 2005]. Esta amidase alifática pertence ao segundo ramo da superfamília das nitrilases [Brenner, 2002; Andrade *et al.*, 2007] e apresenta actividade de hidrolase e de transferase. A actividade de hidrolase é caracterizada pela hidrólise de amidas alifáticas possuindo cadeias curtas de acilo dando origem aos ácidos correspondentes e amónia: Sendo também responsável pela transferência do grupo acilo de amidas alifáticas de cadeia curta para a hidroxilamina, formando acilhidroxamatos e amónia (actividade de transferase):

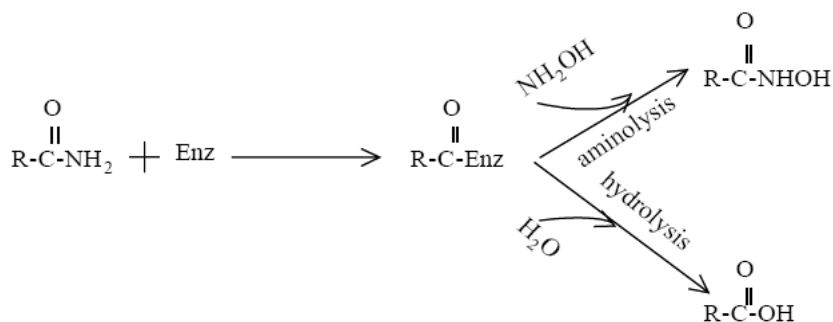
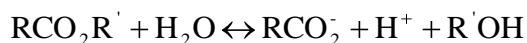
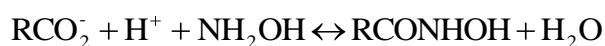


Fig.7 – Esquema das reacções de hidrolase e de transferase (aminólise).

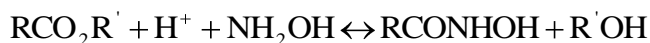
Esta tem ainda a possibilidade de hidrolisar ésteres de cadeia curta tais como metil acetato, etil acetato e n-propil acetato, embora a velocidade destas reacções seja muito inferior à velocidade da reacção para a hidrólise de amidas:



Dentro da actividade de transferase podemos encontrar a transferase ácida:



E a transferase de ésteres:



A estirpe L10 de *Pseudomonas aeruginosa* é um mutante constitutivo para a síntese de amidase produzindo elevados níveis desta enzima. Esta amidase é altamente específica para a acetamida que constitui um excelente substrato permitindo o crescimento desta estirpe em meios contendo acetamida como única fonte de carbono ao passo que a

acetanilida (N-fenil acetamida) é um substrato muito pobre para o seu crescimento. [Brown *et al.*, 1978].

O monómero da amidase demonstra um arranjo do tipo “sandwich” de quatro camadas $\alpha\beta\beta\alpha$ (33% de cadeias α -hélice e 22% de ligações β) as duas folhas β internas, construídas por seis e sete ligações, interconectam-se pelo cruzamento interno de duas folhas [Andrade *et al.*, 2007].

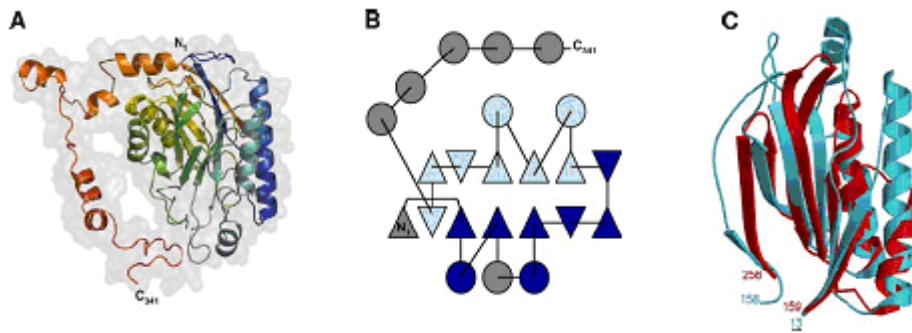


Fig.1: Estrutura do monómero da amidase: A – representação esquemática do monómero de *Pseudomonas aeruginosa*. O monómero revela uma arquitetura em quatro camadas tipo “sandwich” com uma região C terminal extensa incluindo diversos segmentos α -hélice. B – Diagrama da amidase: Δ – ligação β e O – α -hélices. As duas folhas β representadas a azul claro e a azul-escuro são topologicamente equivalentes, o monómero resulta da sua duplicação em conjunto com elementos adicionais da estrutura secundária a cinzento. C – Sobreposição das duas metades do monómero N e C a azul claro e vermelho respectivamente, também presentes na estrutura da família das nitrilases.

Esta topologia estrutural é característico das nitrilases, referência 3.60.110 pelo CATH *protein classification*, com uma banda β de N – terminal adicional e uma longa cadeia C – terminal composta por 5 α -hélices curtas ligadas por segmentos não estruturados. [Andrade *et al.*, 2007]

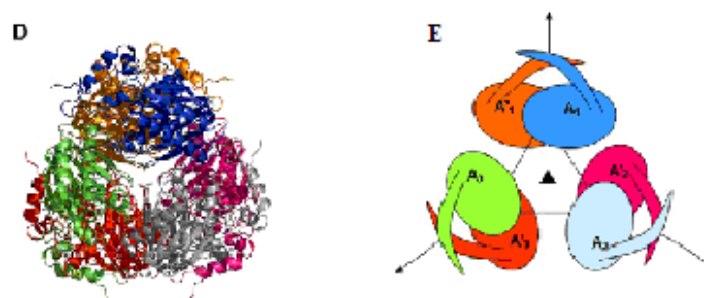


Fig.2: Homo –hexâmero da amidase: D – Vista do hexâmero da amidase segundo o eixo cristalográfico (estrutura terciária da amidase). E – Representação esquemática do hexâmero, na mesma orientação salientando as relações organizacionais segundo os eixos cristalográficos de rotação.

Nas proteínas relacionadas com as nitrilases a actividade catalítica depende da conservação da tríade catalítica constituída pelos aminoácidos Glu⁵⁹, Lys¹³⁴ e Cys¹⁶⁶. Estes grupos funcionais encontram-se localizados a 5Å de distância uns dos outros e com eles encontram-se ainda na cavidade catalítica os grupos Met¹⁹³, Tyr⁶⁰, Trp¹³⁸, Glu¹⁴², Gly¹⁹¹ e Tyr¹⁹² formando uma cavidade com 13Å de profundidade e 23,9Å³ de área. Esta cavidade encontra-se acessível através de uma entrada em forma de túnel.

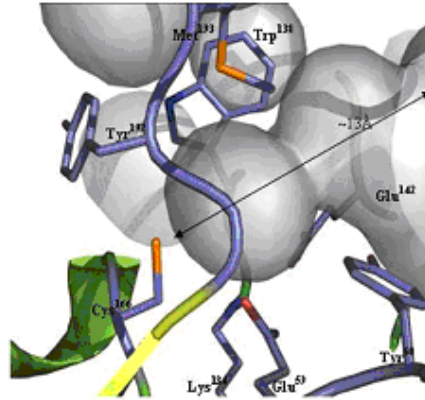


Fig.3: Centro catalítico da amidase: Superfície acessível ao solvente (cinzento) do centro activo da amidase apresentando à sua superfície a tríade Glu⁵⁹, Lys¹³⁴ e Cys¹⁶⁶ em conjunto com outros resíduos constituintes da cavidade (átomos de carbono a azul, oxigénio a vermelho, enxofre a laranja, motivos em hélice a verde e cadeias β a amarelo).

A tríade catalítica encontra-se localizada no topo com o resíduo Cys¹⁶⁶, o agente nucleofílico em proteínas relacionadas com a nitrilase, no topo do motivo estrutural β -turn- α conhecido na família como o laço nucleofílico.

O resíduo Trp¹³⁸ desempenha um papel importante tanto na catálise enzimática como na estabilidade estrutural da amidase alifática dado que a substituição deste resíduo por Gly induz a alteração da especificidade da amidase para os substratos influenciando a sua estabilidade e conformação enzimática. A substituição do resíduo Trp¹³⁸ por Gly ou Ser originou amidase mutante sem afinidade para a ureia e actividades reduzidas para a acetamida e para a acrilamida quando comparadas com a enzima selvagem. Por outro lado, estas mutações permitiram a hidrólise de fenilacetamida bem como de p-nitrofenilacetamida [Andrade *et al.*, 2007].

Outra propriedade relevante da amidase selvagem é a sua elevada estabilidade térmica até 55°C o que a torna invulgarmente termoestável para esta classe de enzimas. A termo-

estabilidade encontra-se relacionada com diversas características estruturais, tais como o efeito hidrofóbico, ligações por pontes de hidrogénio e pontes salinas, distribuição de carga do resíduo, organização interna e tipo de aminoácidos constituintes da proteína. Os trabalhos de investigação associaram o terminal Glu⁵⁹ como responsável pela manutenção da estrutura quaternária da enzima dado que a substituição deste terminal por Val conduziu à dissociação do hexâmero a dímeros com conseqüente perda de actividade enzimática. Assim o arranjo hexamérico descrito em conjunto com o arranjo estrutural promovido pelo envolvimento do braço longo C-terminal, único entre estruturas homólogas conhecidas, podem constituir factores relevantes para a promoção da termo-estabilidade observada nesta enzima. [Andrade *et al.*, 2007].

Nas amidases pertencentes à superfamília das nitrilases confirmou-se por mutagénesis no resíduo Cys166 (cisteína) da amidase de *Pseudomonas aeruginosa* que este actua como nucleófilo no mecanismo catalítico. Demonstrou-se ainda que a tríade catalítica Cys-Glu-Lys se encontra presente em todos os membros da superfamília das nitrilases. A especificidade da amidase de *Pseudomonas aeruginosa* para o substrato codificada pelo gene *amiE* é limitada a amidas de cadeia curta. No entanto, esta especificidade pode ser alargada através de mutações pontuais de modo a incluir amidas de cadeia mais longa tais como a butiramida, valeramida, amidas aromáticas, acetanilida e fenilacetamida. Na estirpe mutante AI3 a mutação *amiE* Thr¹⁰³→Ile é responsável pela especificidade para a acetanilida. A ureia e a hidroxureia são inibidores da amidase de *Pseudomonas aeruginosa* mas no entanto as mutações Arg¹⁸⁸→Cys, His ou Leu; Gln¹⁹⁰→Glu e Trp¹⁴⁴→Cys foram identificadas como responsáveis pelo decréscimo da afinidade da amidase para a ligação com a ureia [Novo *et al.*, 2002].

1.7.2 Inibição da amidase pela ureia:

A ureia actua como inibidor dirigido ao centro activo da amidase de *Pseudomonas aeruginosa* e a inibição é dependente do tempo com a formação de um complexo na estapa reversível seguido de uma etapa irreversível [Brown e Gregoriou, 1979]. A hidroxilamina provocou a libertação da ureia ligada ao complexo inactiva enzima-ureia com a recuperação da actividade enzimática. A ureia ligada limita a titulação de grupos –SH para 6 grupos por molécula hexamérica e protege-a da inactivação térmica sugerindo que a ligação da ureia provoca uma alteração de conformação na molécula da enzima. As

mutações provocadas no gene da amidase apresentavam uma redução na afinidade de ligação à enzima pelas ambas, a ureia e a acetamida, cujos aminoácidos foram identificados por sequenciação directa dos genes mutados amplificados por PCR e confirmados por sequenciação de genes clonados amplificados. Os resíduos Arg-188 e Trp-144 estão implicados na ligação da ureia e da acetamida ao centro activo da amidase de *Pseudomonas aeruginosa*.

1.18 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA O DOSEAMENTO DA UREIA

Embora se encontrem disponíveis métodos espectrofotométricos e colorimétricos para a determinação da concentração de ureia, os métodos enzimáticos são mais selectivos, factor que leva a que estes sejam geralmente preferidos em detrimento dos primeiros. [Chou *et al.*, 2008]. A aplicação de sensores enzimáticos para a determinação potenciométrica da ureia tem já sido largamente utilizada, com recurso a diversas técnicas de imobilização e a diferentes transdutores. Existem diversos autores que referem a utilização de biossensores potenciométricos para a detecção da ureia em análises químicas. Eléctrodos selectivos a iões, eléctrodos sensíveis ao gás de amónia e eléctrodos de pH têm sido aplicados para a determinação de iões amónio e iões H⁺ os quais são produzidos pela decomposição da ureia na presença de urease [Kuralay *et al.*, 2005].

Alguns do biossensores construídos para a determinação da ureia apresentam elevada estabilidade operacional, baixos limites de detecção e tempos de resposta baixos mas pecam por não terem sido optimizados em amostras reais, o que coloca em questão a sua aplicabilidade prática. De entre estes exemplos realcem-se os trabalhos conduzidos por Osaka *et al.* (1996), estes autores desenvolveram um biossensor para a ureia baseado na ligação covalente da enzima urease, com recurso a um transdutor potenciométrico, obtendo um limite de detecção da ordem de $3 \times 10^{-5} \text{M}$ e uma estabilidade superior a 30 dias. Outros biossensores têm sido construídos para a determinação de ureia no sangue, na saliva, na urina e no leite. Verma *et al.* (2008), desenvolveram um biossensor descartável para a determinação de ureia no leite baseado na adsorção física, com recurso a um transdutor potenciométrico, este apresentou um tempo de resposta de 2 min e um limite de detecção na ordem de 1,66mM. [Osaka *et al.* (1996), Verma *et al.* (2008), Singh *et al.*, 2008].

Não existem até à data métodos enzimáticos alternativos à aplicação da urease para a determinação da ureia [Singh *et al.*, **2008**].

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS:

2.1. REAGENTES:

Glutaraldeído 25% da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Membranas de polietersulfona modificadas (PES) (Ultrabind, US450 0,45 µm) fornecidas por Gelman (USA) e Porablot[®] nylon (NY) plus fornecidas por Macherey-Nagel, Germany. O leite (marca Mimosa) foi adquirido de um supermercado ao passo que a amostra de vinho caseiro foi obtido de produção tradicional. Os restantes reagentes utilizados eram de grau pró-análise.

2.2 MATERIAIS:

A estirpe mutante constitutiva de *Pseudomonas aeruginosa* L10 foi isolada no laboratório.

O eléctrodo selectivo de iões amónio (ISE) da ELIT e software correspondente fornecidos pela NICO2000 (UK). A centrífuga de bancada Janetzki T30 (Alemanha) e centrífuga de bancada refrigerada Hermle Z383K (Alemanha). No decorrer de todo o trabalho foram utilizadas micropipetas Gilson (França) e VWR (Alemanha). Membranas de Filtração Durapore, 0,45µm HV e Filtros Swinnex non-sterile fornecidos pela Interface (Portugal). Membranas de Polietar sulfona (PES) modificada (tamanho de poro - 0,45µm; espessura - 152µm), e Porablot NY Plus fornecidas pela VWR (Alemanha).

2.3 MÉTODOS:

2.3.1 Estirpe bacteriana, meio e condições de crescimento para a produção de enzima

A estirpe mutante constitutiva de *Pseudomonas aeruginosa* L10 foi usada como fonte de extracto celular contendo actividade de amidase.

2.3.1.1 Seleção de colónias produtoras de amidase

O meio selectivo foi usado para o isolamento de células de *Pseudomonas aeruginosa* L10 produtoras de amidase com a seguinte composição: 20ml de meio basal, 1,5g agar e 79 ml de água desmineralizada. O pH foi ajustado para 7,2 e autoclavado durante 15 min a 121°C. Após o seu arrefecimento, foi adicionada uma solução de acetamida (10%, p/v) previamente esterilizada por filtração, ao meio de cultura [Brown *et al.*, 1972]. O meio completo foi distribuído em Placas de Petri (10ml) que foram posteriormente inoculadas com a estirpe mutante de *Pseudomonas aeruginosa* L10 conservada em meio solido. As placas foram incubadas a 37°C durante alguns dias até a obtenção de colónias visíveis.

2.3.1.2 Crescimento de células em descontínuo

As colónias foram posteriormente inoculadas assepticamente, com o auxílio de uma ansa esterilizada, em balões erlenmeyer contendo 50mL de meio basal, sulfato de amónio e lactato de sódio [Brown e Clarke, 1972]. As culturas foram crescidas numa incubadora com agitação orbital a 37°C e 250 rpm. O crescimento da cultura foi acompanhado a A_{540} do caldo de fermentação até este atingir $\geq 1,5$. O meio basal fresco e esterilizado foi inoculado com os pré-inóculos previamente crescidos (10% (v/v)) perfazendo o volume total de 500mL em balões de 2000 mL. A incubação destes decorreu a 37°C e 250 rpm e o crescimento das culturas foi acompanhado a A_{540} até este atingir $\geq 1,5$.

2.3.1.3 Crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* L10 em batch no fermentador de laboratório

O fermentador de laboratório de 5 litros foi carregado com 2,250 litros de meio de cultura estéril que foi inoculado com um pré-inóculo previamente crescido (10% (v/v)) perfazendo o volume total de 2500 mL. O crescimento da cultura foi realizado a 37°C, 150rpm, sem arejamento a pH 7,2 e acompanhado a A_{540nm} até este atingir $\geq 1,5$.

2.3.2 Conservação de células

A recolha das células foi efectuada por centrifugação do caldo de cultura a 15500xg durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e os sedimentos foram lavados

com soro fisiológico 0,85% (m/v). O ciclo repetiu-se três vezes. Os sedimentos foram resuspendidos no mínimo volume de soro fisiológico contendo glicerol a uma concentração final de 15% (v/v). Esta suspensão celular foi distribuída em tubos eppendorf estéreis (100µl) e conservados a -20°C.

2.3.3 Preparação do extracto celular

As células foram recolhidas e lavadas de acordo com o ponto 2.2.2 o sedimento foi resuspendido em dois volumes de TMEGB 20 mM contendo 1 mM β-mercaptoetanol, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) glicerol e 1mM benzamidina a pH 7,2 e colocado num banho de gelo. O rebrandamento celular foi efectuado pela técnica de ultra-sons recorrendo a ciclos de 20s a 150W de potência, com intervalos de 5 minutos entre cada ciclo. A suspensão obtida foi posteriormente centrifugada a 15500xg rpm durante 30 minutos a 4°C sendo o sobrenadante (extracto celular) recolhido e armazenado a -20°C.

2.3.4 Determinação de proteína

A determinação da quantidade de proteína do extracto celular foi efectuada pelo método de Bradford [Bradford, 1976] usando o corante azul de Coomassie e albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.3.5 Determinação da actividade enzimática da amidase no extracto celular por Potenciometria

A actividade enzimática da amidase livre e imobilizada de *Pseudomonas aeruginosa* foi determinada com recurso ao eléctrodo selectivo a iões amónio (ISE). Os ensaios decorreram utilizando acetamida 0,1M como substrato num tampão adequado. A curva de progresso da reacção foi seguida por alguns minutos e a velocidade inicial da reacção foi determinada ($\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$) como a resposta do biossensor. O aumento da concentração de iões amónio foi medida em função do tempo de modo a monitorizar a taxa de hidrólise da acetamida na presença de amidase no extracto celular. Uma unidade de biossensor (UB) é definida como a quantidade de enzima necessária para provocar a alteração de 1 mV por min, no potencial (E) do eléctrodo, a 25°C em determinadas condições experimentais.

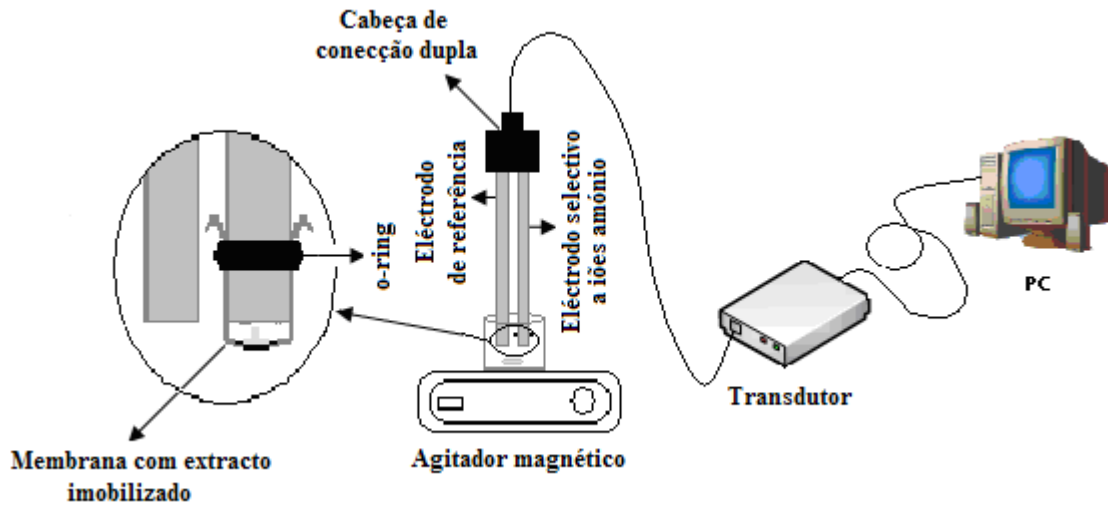


Fig. 2.1: “Setup” experimental para o biossensor potenciométrico: Eléctrodo seletivo a íões amónio contendo a membrana de polietersulfona (PES) ou outra contendo extracto celular imobilizado de *Pseudomonas aeruginosa* e eléctrodo de referência, célula electroquímica, agitador magnético e PC.

Transdutor: O elemento transdutor é um potenciómetro com um eléctrodo seletivo a íões amónio (ELIT). A amidase catalisa a hidrólise da acetamida originando ácido acético e íões amónio. O eléctrodo enzimático consiste na imobilização de extracto celular contendo actividade de amidase sobre membranas de polietersulfona (PES) ou porablot NY plus, esta é posteriormente montada na superfície do eléctrodo seletivo a íões amónio (ISE) por meio de um o-ring tal como demonstrado na figura 2.1. A curva de calibração de NH_4Cl em função das leituras em mV foi realizada em tampão Tris 20mM a pH 7,2. A curva de calibração do eléctrodo é dada pelo gráfico das leituras em mV vs $\log [\text{NH}_4\text{Cl}]$ [Martins *et al.*, 2006]. Todas as leituras potenciométricas foram efectuadas num volume de 4 ml de acetamida 0.1M em tampão Tris 20mM pH 7,2 à temperatura ambiente com agitação constante.

2.3.6 Optimização das condições de imobilização:

Com o intuito de se recorrer ao design experimental efectuou-se um estudo preliminar dos parâmetros intervenientes na imobilização de modo a obter-se os níveis alto e baixo necessários para posterior aplicação da metodologia ANOVA. [Montgomery, (2005)]

2.3.6.1 Influência da [Glutaraldeído]

As misturas continham 50uL de extracto celular (6090,6 UB.mL⁻¹), 10uL Gelatina (25%, p/v) e quantidades variáveis de 2, 4, 6, 8 e 10µL de GA (5%, v/v) respectivamente, perfazendo o volume final de 85µL de mistura com TMEGB contendo 1 mM β-mercaptoetanol, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) glicerol e 1mM benzamidina a pH 7,2. Depositou-se 65 µL de cada uma destas misturas sobre membranas de 20mm de diâmetro de Poliétersulfona (PES) ou Porablot NY Plus com uma área superficial de 3,14 cm². Após um dia de secagem a 4°C , as membranas foram lavadas com 3mL de TMEGB 20mM pH 7,2 para remover a proteína não adsorvida. As membranas foram montadas sobre a superfície do eléctrodo selectivo a iões amónio com recurso a um o-ring e a parafilme de acordo com a **figura 2.1**. A resposta do biossensor, em termos de velocidade inicial da reacção (mV.min⁻¹), foi obtida seguindo a reacção em 4mL de acetamida 0,1M preparada em tampão Tris 20mM pH 7,2 sendo os ensaios realizados em triplicado.

2.3.6.2 Influência da [Gelatina]

As misturas continham 50uL de extracto celular (6090,6 UB.mL⁻¹), volume de GA (5%) previamente optimizado e 10uL de gelatina a concentrações variáveis de 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40% perfazendo o volume final de 85µL de mistura com TMEGB contendo 1 mM β-mercaptoetanol, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) glicerol e 1mM benzamidina a pH 7,2. O restante procedimento efectuou-se de acordo com 2.3.6.1.

2.3.6.3 Influência da quantidade de extracto celular

As misturas continham o volume de GA (5%) e 10ul de gelatina nas proporções previamente optimizadas e 10, 20, 30, 40 e 65 µL de extracto celular (6090,6 UB.mL⁻¹), perfazendo o volume final de 85µL de mistura com TMEGB contendo 1 mM β-mercaptoetanol, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) glicerol e 1mM benzamidina a pH 7,2. O restante procedimento efectuou-se de acordo com 2.3.6.1.

2.3.6.4 Planeamento experimental para a optimização dos parâmetros intervenientes na imobilização:

Oito membranas foram preparadas combinando os diversos factores intervenientes na imobilização nos intervalos previamente estabelecidos: 2 e 4 μ L glutaraldeído (5%) na mistura; 25 e 30 μ L de Extracto celular (6090,6 UB.mL⁻¹) na mistura e 10 μ L Gelatina (15 e 20%, p/v) na mistura, perfazendo o volume final de 85 μ L de mistura com TMEGB 20mM pH 7,2. Foram pipetados 65 μ L de mistura por membrana e as leituras efectuadas em 4mL de acetamida 0,1M preparada em tampão Triz 20mM pH 7,2. Os ensaios decorreram à temperatura ambiente e foram realizados em triplicado. Os resultados foram tratados pela metodologia ANOVA. [Montgomery, (2005)]

2.3.7 Optimização do pH de imobilização

O estudo da influência do pH na resposta do biossensor (amidase imobilizada) e na resposta potenciométrica para a enzima livre, dada em termos de velocidade inicial da reacção mV.min⁻¹ efectuou-se de acordo com o seguinte procedimento:

Enzima imobilizada: Foram imobilizados 65 μ L de uma mistura contendo 2 μ L de GA 5% + 10 μ L Gelatina 15% (m/v)+ 30 μ L de extracto celular (6090,6 UB.mL⁻¹) (sistema previamente optimizado), perfazendo o volume final de 85 μ L de mistura com TMEGB, por membrana (PES). A resposta do biossensor foi obtida, em termos de velocidade inicial da reacção (mV.min⁻¹), seguindo a reacção em 4mL de acetamida 0,1M preparada em tampão adequado. Os tampões utilizados foram os seguintes: tampão acetato de sódio 20 mM a pH 4,5, 5,0 e 6,0; tampão Fosfatos 20 mM a pH 6,0; 6,5 e 7,2 e tampão Tris 20 mM a pH 7,2, 8,0 e 8,5. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Enzima livre: Obteve-se a resposta do biossensor, em termos de velocidade inicial da reacção (mV.min⁻¹), seguindo a reacção em 4mL de acetamida 0,1M preparada em tampão adequado após adição de 30 μ L de extracto celular (6090,6 UB.mL⁻¹). Os tampões alvos de estudo foram os utilizados para a enzima imobilizada.

2.3.8 Determinação da influência do tempo de incubação com a ureia

Foram preparadas 5 membranas pipetando 65 μ L da mistura nas proporções previamente optimizadas sobre a sua superfície e após 24h de reacção a 4°C as membranas foram lavadas com 3 mL de tampão Tris 20mM pH 7,2 com o intuito de remover a proteína não adsorvida. Posteriormente, as membranas foram montadas de acordo com o esquema da figura 2.1. e a reacção enzimática/resposta do biossensor foi seguida por um período de 3 min em 4 mL de acetamida 0,1M preparada em tampão Tris 20 mM pH=7,2. Após lavagem das membranas em tampão Tris 20mM pH 7,2 até a leitura em ppm apresentar valores próximo de zero, procedeu-se à sua incubação em 4mL de uma solução de 2 μ M ureia preparada em tampão Tris 20mM pH 7,2 para vários intervalos de tempo: t=0, 20, 40, 60 e 80 min. Posteriormente as membranas foram montadas de acordo com o esquema da figura 2.1. e a reacção enzimática/resposta do biossensor foi seguida no ISE sendo os ensaios realizados em triplicado.

2.3.9 Doseamento de ureia pelo biossensor

A resposta do biossensor foi determinada usando uma mistura reaccional contendo acetamida 0.1M em tampão tris 20 mM pH 7,2 na ausência da ureia. Seguidamente, a mesma membrana foi lavada várias vezes com o mesmo tampão e incubada com concentrações diferentes de ureia em tampão tris 20 mM pH 7,2 durante 30 min. As membranas foram lavadas com tampão e usadas no ISE para obter a resposta do biossensor na mistura reaccional contendo acetamida 0.1M em tampão tris 20 mM pH 7,2. Todos os ensaios foram efectuados em triplicado e a resposta do biossensor foi determinada em termos da diferença entre os declives da reacção antes e após incubação nas soluções de ureia ($\Delta mV \cdot \text{min}^{-1}$) [Campanella *et al* 2005; Stoytcheva 2002; Ivanov *et al* 2003; Campanella *et al* 2007; Joshi *et al* 2005; Kok *et al* 2002; Gulla *et al* 2002; Shan *et al* 2004; Sotiropoulou e Fournier, 2005].

2.3.10 Performance do Biossensor para a ureia no vinho

A resposta do biossensor para a ureia foi determinada utilizando uma mistura reaccional contendo 0.1M acetamida em tampão Tris 20mM pH 7,2 na ausência de ureia. Subsequentemente, as mesmas membranas após terem sido lavadas diversas vezes para

remoção de resíduos de acetamida e iões amónio foram incubadas em 4 mL de um vinho caseiro por um período de 35 min contendo concentrações variáveis conhecidas de ureia de 2, 4, 6, 8 e 10×10^{-6} M. As membranas foram posteriormente lavadas com tampão Tris e utilizadas para determinar a resposta do biossensor utilizando acetamida 0,1M em tampão Tris 20mM pH 7,2 sendo estes ensaios realizados em triplicados. A resposta do biossensor foi determinada em termos da diferença entre os declives da reacção antes e após incubação nas soluções de ureia ($\Delta mV \cdot \text{min}^{-1}$). Com base na curva obtida foi determinado o tempo de resposta, sensibilidade e limite de detecção do biossensor para a ureia [Thévenot *et al*, (1999)]. O limite de detecção foi definido como a quantidade de ureia necessária para provocar um decréscimo na resposta do biossensor correspondente a 10% da resposta inicial. [Amine *et al*, (2006)][Mohammadi *et al*, (2005)].

2.3.11 Performance do Biossensor para a ureia no leite

A quantificação de ureia no leite foi efectuada da mesma forma que no vinho acima descrita, com a excepção da utilização de membrana Porablot NY Plus contendo o extracto celular imobilizado exibindo actividade de amidase de *Pseudomonas aeruginosa*.

2.3.12 Regeneração do biossensor

As membranas previamente usadas no doseamento de ureia no leite foram regeneradas através da reactivação com hidroxilamina 20 mM pH 7,0 à temperatura ambiente durante 30 min. As membranas regeneradas foram usadas para quantificar a resposta do biossensor na mistura reaccional acima descrita. Estes ensaios foram realizados em triplicados e a resposta do biossensor representada em termos de mV/min no volume final da mistura reaccional de 4ml.

2.3.13 Estabilidade do biossensor

As membranas contendo o extracto celular imobilizado foram armazenadas em TMEGB pH 7,2 a 4°C sendo a resposta do biossensor para estas membranas determinada ao longo de 55 dias utilizando acetamida 0,1M em tampão Tris 20mM pH 7,2.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1 CRESCIMENTO BACTERIANO:

3.1.1 Curva de crescimento da estirpe L10 de *Pseudomonas aeruginosa* em Batch:

Acompanhou-se o crescimento da estirpe L10 de *Pseudomonas aeruginosa* em “batch” num fermentador de laboratório de acordo com o descrito em 2.3.1.2. A curva característica de crescimento está representada na **figura 3.1** onde são visíveis as fases de latência, a fase exponencial e a fase estacionária.

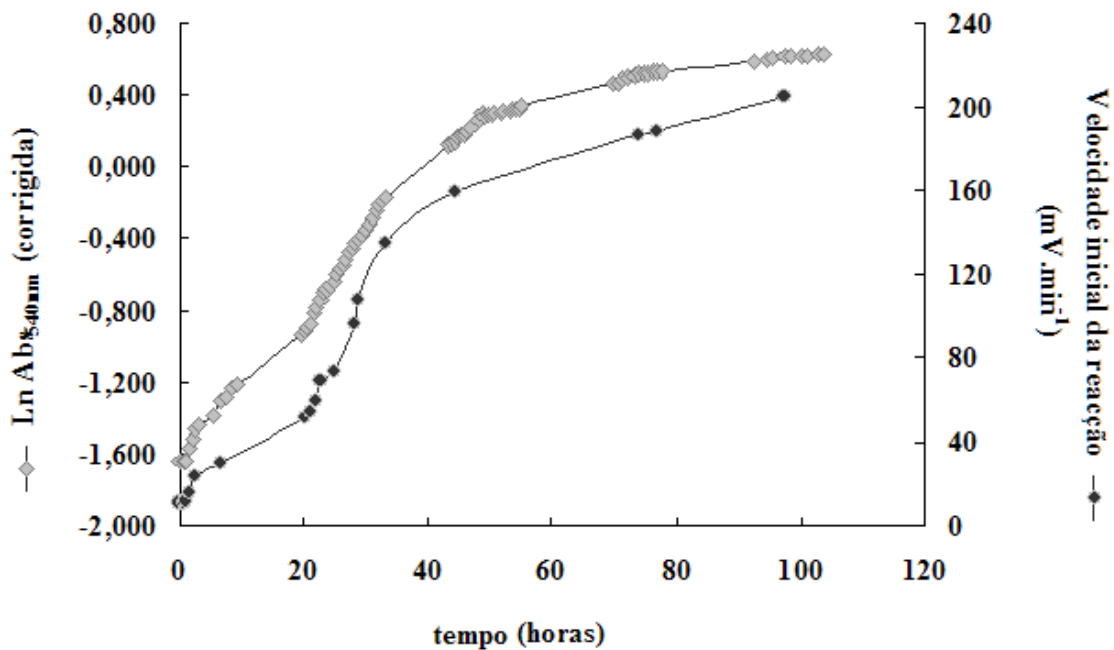


Figura 3.1: Curva de crescimento bacteriano em “batch” da estirpe L10 de *Pseudomonas aeruginosa*: Vmeio=2000mL; Agitação=250rpm; T=37°C; Volume do fermentador=5000mL.

3.1.2 Tempo de duplicação (t_d) e taxa específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$):

A taxa específica de crescimento depende do tipo de células e das características do meio de crescimento, descrevendo o comportamento do crescimento de uma cultura e sendo variável ao longo do crescimento sendo máxima e constante na fase exponencial.

Ajustando uma recta à zona exponencial da curva de crescimento obtém-se a equação:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu_{m\acute{a}x} \times t$$

$$\ln ABS_{540nm} = 0,06 \times t - 2,2$$

O declive desta dá-nos a taxa específica de crescimento $\mu_{m\acute{a}x} = 0,06h^{-1}$ o tempo de duplicação é dado aplicando a expressão:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}}$$

Assim para o presente crescimento obteve-se $t_d = 11h$.

As condições de crescimento utilizadas demonstraram conduzir a uma baixa taxa específica de crescimento e conseqüentemente a um tempo de duplicação elevado. Realce-se que a taxa específica de crescimento depende grandemente do tipo de microrganismo e das características do meio de crescimento, mas também dos diversos parâmetros que o influenciam: pH, temperatura, agitação e arejamento os quais não foram optimizados. Não era objectivo do presente trabalho a optimização destes parâmetros, mas sim somente a obtenção de células com elevada actividade enzimática de amidase o que se conseguiu. Outros crescimentos, na presença de arejamento, revelaram taxas específicas de crescimento mais elevadas mas actividade catalítica de amidase nula (trabalhos desenvolvidos pela equipa de investigação do CIEQB). Os presentes resultados sugerem a necessidade do estudo de optimização das condições de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* L10 em “batch”, de modo a compreender o motivo pelo qual taxas específicas de crescimento mais elevadas conduzem a menor produção de amidase e também de modo a definir as condições óptimas de crescimento quando se passa para a produção de células no fermentador de laboratório.

3.2 EXPERIÊNCIAS PRELIMINARES PARA A DETERMINAÇÃO DE UREIA NO LEITE E EM TAMPÃO TME:

3.2.1 Calibração do eléctrodo:

Previamente efectuou-se a calibração do eléctrodo selectivo de iões amónio de acordo com o procedimento descrito em 2.3.5. Numa abordagem inicial a recta de calibração do eléctrodo foi efectuada em tampão TME 20mM pH=7,2 **Figura 3.2:**

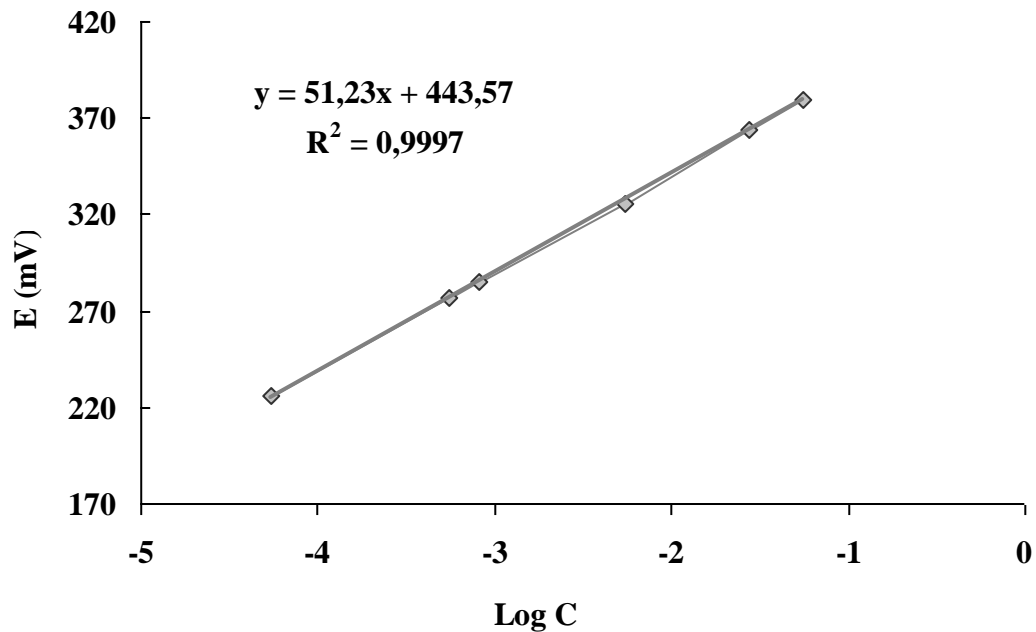


Figura 3.2 – Recta de calibração do eléctrodo efectuada em tampão TME 20mM pH=7,2.

3.2.2 Efeito da presença de ureia na resposta do eléctrodo:

Alguns estudos preliminares foram efectuados com o intuito de se testar se o processo de determinação de ureia com recurso à inibição da enzima amidase é concretizável.

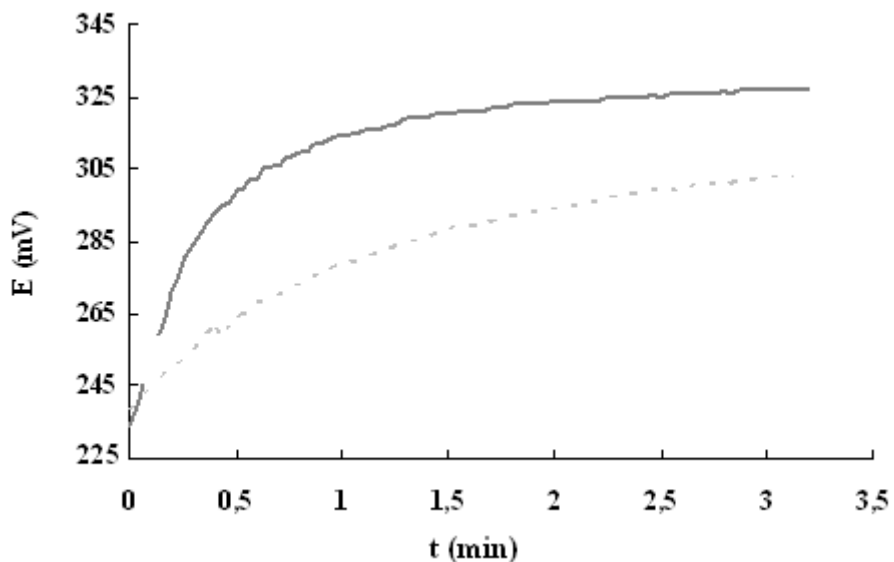


Figura 3.3 – Sensograma. Leituras efectuadas em acetamida 0,1M preparada em tampão TME 20mM pH=7,2: — na ausência de ureia, - - - na presença de ureia 10µM.

Este estudo preliminar revelou o nítido decréscimo da resposta do biossensor na presença da ureia. Ou seja a presença de ureia conduziu a um decréscimo da velocidade da reacção de hidrólise da acetamida a iões amónio.

3.2.3 Comportamento da resposta do eléctrodo na presença e na ausência de ureia:

Efectuou-se o estudo da influência de quantidades crescentes de ureia na variação da resposta do biossensor (dada em termos de velocidade inicial da reacção – $\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$) em tampão TME 20 mM e também numa amostra de leite. Os resultados obtidos estão apresentados nas **Figuras 3.1 e 3.2** respectivamente:

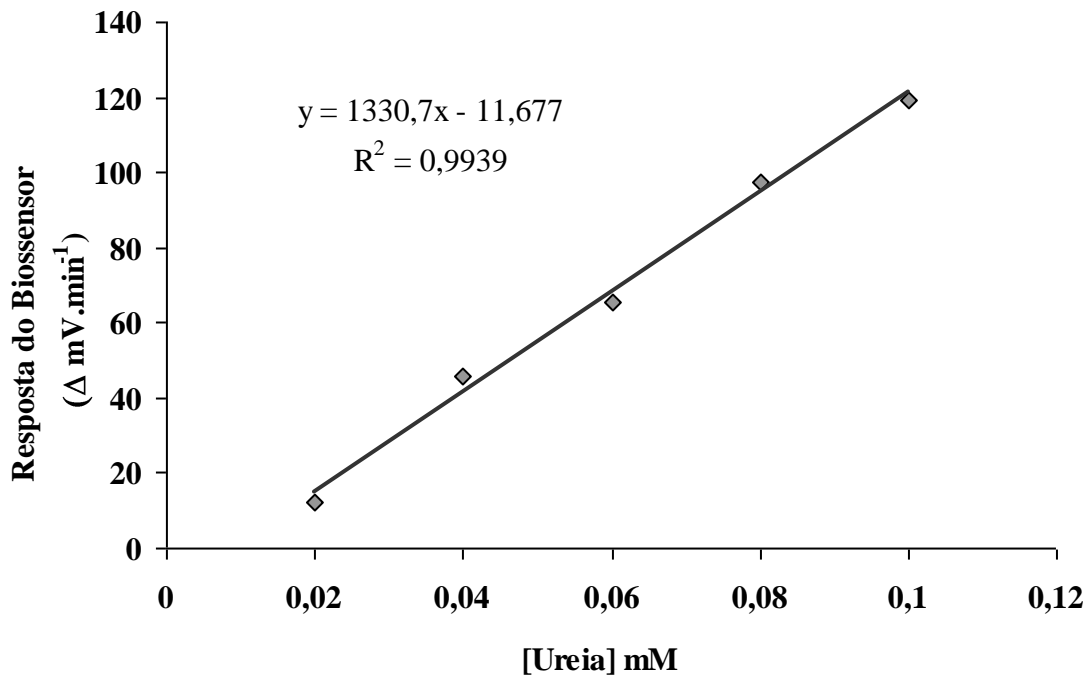


Figura 3.4 – Resposta do biossensor para valores crescentes de concentração de ureia preparada em tampão TME. Imobilizou-se 65 μL de uma mistura contendo 65 μL de extracto celular, 5 μL (GA 5%) e 10 μL (gelatina 25%) sobre uma membrana Porablot NY Plus. O tempo de inibição foi de 30 minutos nas diferentes concentrações de ureia. Ensaio foram efectuados em Acetamida 0,1 M preparada em tampão TME 20 mM pH=7,2.

O estudo efectuado revelou existir uma relação linear entre concentrações crescentes de ureia e decréscimo da resposta do biossensor ($\Delta\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$), tanto quando efectuado em tampão Tris **Figura 3.4** para concentrações de ureia de 2 – 12 $\times 10^{-2}$ mM como no leite

Figura 3.5, para concentrações de ureia $2 - 8 \times 10^{-1}$ mM. Deste modo é possível desenvolver um biossensor para a determinação de concentrações de ureia no leite e outros analitos. É de notar que estes resultados têm só um cariz preliminar, as proporções de GA, gelatina e extracto celular intervenientes no processo de imobilização bem como tempo de incubação das membranas não se encontravam optimizados.

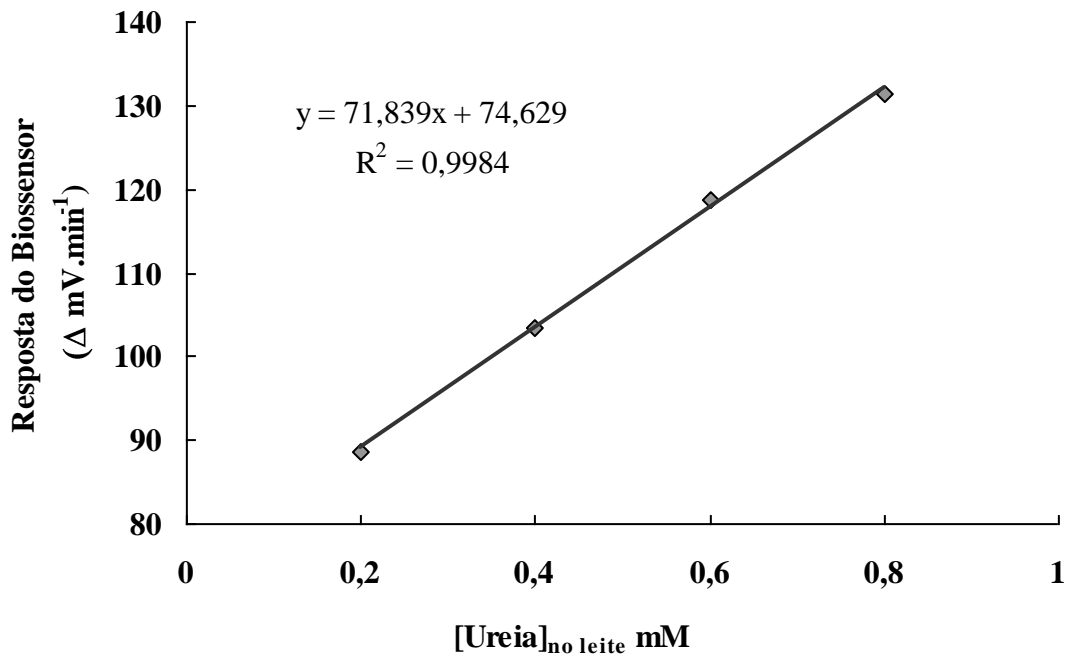


Figura 3.5 – Resposta do biossensor para valores crescentes de ureia. Imobilizou-se 65μL de uma mistura contendo 65uL de extracto celular, 5 μL (GA 5%) e 10 μL (gelatina 25%) sobre uma membrana Porablot NY Plus. O tempo de inibição foi de 30 minutos nas diferentes concentrações de ureia no leite comercial. Ensaio foram efectuados em Acetamida 0,1 M preparada em tampão TME 20 mM pH=7,2

3.3 OPTIMIZAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR:

3.3.1 Recta de calibração:

Embora os estudos preliminares tenham sido efectuados com tampão TME os estudos subsequentes serão realizados com acetamida preparada em tampão tris, dado que o objectivo é determinar níveis de ureia na ordem dos micromolar, ao remover-se os protectores estamos a garantir que a enzima presente no extracto celular imobilizado esteja mais susceptível à inibição pela ureia.

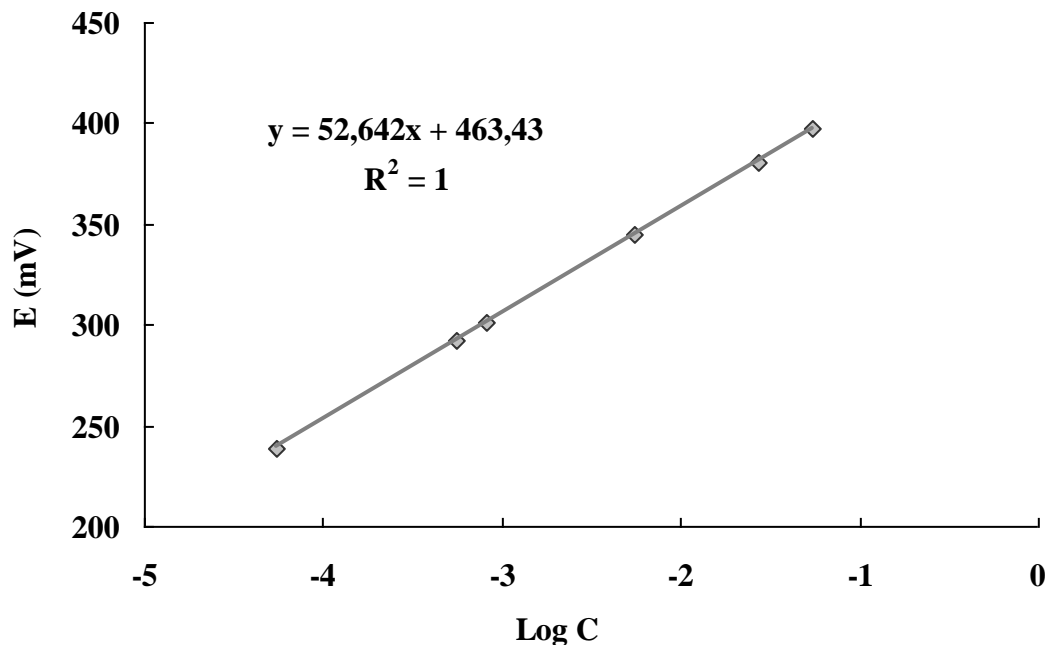


Figura 3.6 – Recta de calibração do eléctrodo efectuada em tampão Tris 20mM pH=7,2.

3.3.2 Escolha da concentração de Substrato:

A concentração de substrato a empregar deve de ser criteriosamente escolhida pois afecta a resposta do biossensor quer antes quer após a inibição. Assim para o presente trabalho foram tidos em consideração os argumentos apresentados por Dzyadevych *et al.*, 2004. Segundo este autor, no caso de inibição reversível, para concentrações de substrato elevadas, tanto o substrato como o inibidor interagem simultaneamente com a enzima imobilizado e a sensibilidade ao inibidor decresce com o aumento da concentração de substrato. Tal comportamento observa-se somente quando estamos perante inibição reversível [Dzyadevych *et al.*, 2004]. No entanto no nosso caso o problema de existir competição entre o inibidor (ureia) e o substrato (acetamida) não se apresenta, dado que a membrana é incubada previamente na solução de ureia na ausência do substrato. Deste modo não existe competição. A enzima entra em contacto com o substrato somente após a inibição por um período muito curto de tempo, dado que somente nos interessam os primeiros 20 a 30 segundos da reacção. Neste espaço de tempo o efeito predominante é o da ligação do substrato aos centros activos livres da enzima. Perante isto, interessa-nos

utilizar uma concentração saturante de substrato (acetamida 0,1M) dado que para baixas concentrações de substrato, o efeito inibitório, qualquer que seja o inibidor utilizado, é menor uma vez que o decréscimo da resposta do biossensor não fornece uma indicação correcta da quantidade de enzima realmente inibida na presença do agente inibidor [Dzyadevych *et al.*, 2004].

3.3.3 Optimização das condições de imobilização:

A performance de um biossensor é grandemente dependente da sua configuração. Diversos autores estudaram a influência da camada imobilizada sobre a resposta do biossensor, tanto no que diz respeito à sua espessura como às proporções dos diversos intervenientes no processo de imobilização. Estes demonstraram que a sensibilidade, limite de detecção e tempo de vida do biossensor são fortemente influenciados pelo tipo e configuração do método de imobilização aplicado [Shan *et al.*, 2004; Ciucu *et al.*, 2003; Soldaktin *et al.*, 2000]. A imobilização enzimática permite a reutilização da enzima, a redução de custos, o aumento da estabilidade e nalguns casos o aumento da actividade enzimática. Permite ainda melhores condições de manuseamento e operação. [Oliveira e Vieira, 2006; Choi, 2004]. O principal problema durante o processo de imobilização de uma enzima pode ser a perda parcial ou total da actividade, que pode ser atribuída a diversos factores, como propriedades da própria enzima, do suporte, dos reagentes utilizados e das condições experimentais [Oliveira e Vieira, 2006]. Deste modo é essencial estudar a influência de todos os componentes intervenientes no processo de imobilização, de modo a obter-se a resposta máxima do biossensor.

As membranas PES utilizadas no presente trabalho fornecidas pela Pall Sciences são activadas de modo a permitir a ligação covalente de proteínas. Possuem uma elevada concentração de grupos activos aldeído disponíveis para a ligação covalente com ligandos amino. A ligação com as poliaminas é extremamente estável e acontece imediatamente após contacto, os centros activos são inertes à água e ao oxigénio orgânico provenientes de solventes orgânicos. Proteínas e péptidos podem ligar-se covalentemente através de reacções entre o seu grupo amino livre e o grupo aldeído da membrana.

Para otimizar os parâmetros de um biossensor, o método e condições de imobilização de da enzima devem de ser desenvolvidos para cada enzima individualmente. O método de imobilização testado no presente trabalho envolve a formação de ligações cruzadas pela

utilização de um reagente bifuncional, o glutaraldeído (GA), juntamente com a aplicação de gelatina.

O design experimental é uma ferramenta poderosa nos estudos de optimização. Esta exige uma compreensão global e objectiva do processo a optimizar, a escolha dos factores a ser estudados e selecção dos níveis (que dizem respeito a um intervalo de valores, onde nível alto se refere ao limite máximo e nível baixo ao limite mínimo dos factores a optimizar), selecção da variável de resposta a qual deve fornecer informação útil sobre o processo em estudo, escolha do design experimental que envolve a escolha do número de replicados e selecção da ordem pela qual as experiências serão conduzidas, realização das experiências pela ordem pré-determinada, análise de dados e conclusões [Montgomery, (2005)]. Com o objectivo de proceder à selecção dos níveis, efectuou-se uma optimização prévia dos três factores intervenientes na imobilização, Gelatina, GA e Extracto celular. Para cada um destes factores escolheu-se um intervalo de máxima resposta do biosensor ($\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$), onde o extremo mínimo corresponde ao nível baixo e o extremo máximo ao nível alto.

3.3.3.1 Optimização da concentração de glutaraldeído:

O processo de imobilização com recurso ao GA é um processo de imobilização química. A maior desvantagem que pode advir da utilização do GA é a possibilidade de perda de actividade provocada pela distorção da conformação do centro activo da enzima ou derivada de alterações químicas do centro activo durante a reacção [Choi, M.M.F.; 2004]. A determinação da influência da concentração de glutaraldeído na resposta do biossensor, em termos de velocidade inicial da reacção $\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$, foi feita de acordo com o descrito em 2.3.6.1. conduzindo aos resultados expressos na **Figura 3.7**.

Deste modo prosseguiu-se o estudo de optimização aplicando 0,24% (v/v) GA na mistura reaccional visto ter sido o valor que apresentou melhor resposta do biossensor. Os níveis baixo e alto escolhidos foram 0,12% (v/v) GA (2 μL GA 5% na mistura reaccional) e 0,24% (v/v) GA (4 μL GA 5% na mistura reaccional) respectivamente, dado terem sido os volumes de GA na mistura para os quais se obteve maior resposta do biossensor.

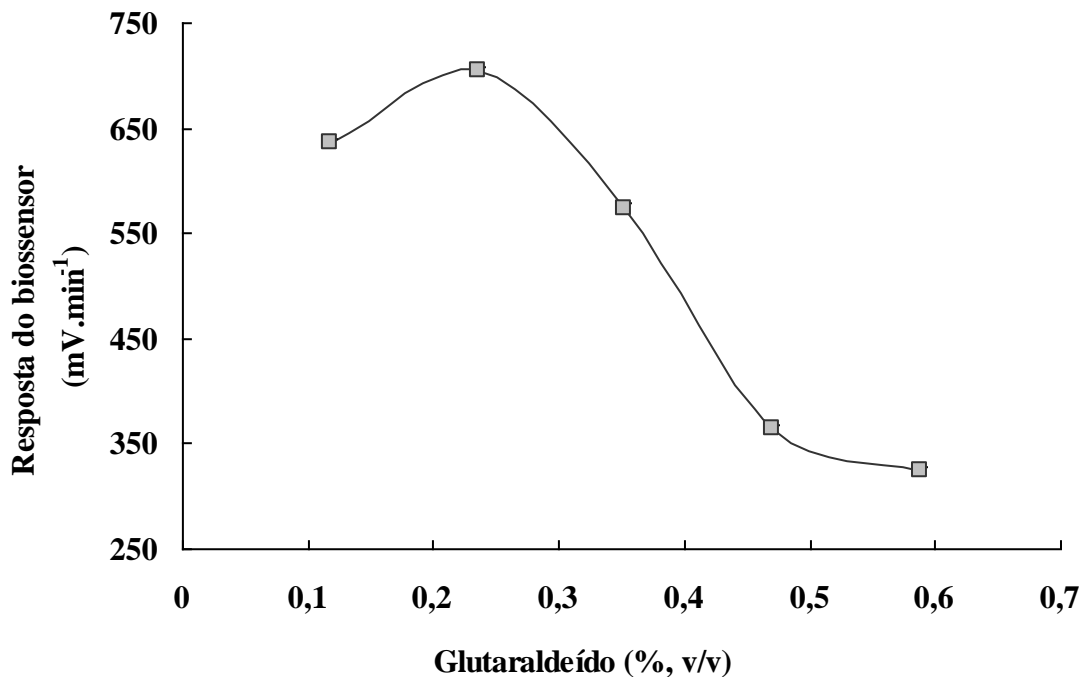


Figura 3.7 – Influência da quantidade de Glutaraldeído (GA) na resposta do biossensor dada em termos de velocidade inicial da reação ($\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$). De acordo com o descrito em 2.3.6.1. Todos os ensaios foram realizados em triplicado estando representada a barra de erros.

3.3.3.2 *Optimização da quantidade de gelatina:*

O GA permite a formação de ligações cruzadas entre as moléculas de enzima e entre estas e o suporte. Estudos experimentais preliminares realizados revelaram alguma ineficácia na imobilização ao recorrer-se somente ao GA no presente processo de imobilização enzimática, conduzindo à remoção de grande parte do enzima da superfície da membrana, pelo que se adicionou gelatina ao método de imobilização. A gelatina é uma proteína inerte na análise em questão. Esta foi adicionada com o objectivo de aumentar o número de ligações cruzadas no intuito de se obter maior resistência física da camada imobilizada, contornando-se assim a dificuldade observada. O estudo foi realizado de acordo com o descrito em 2.3.6.2. o comportamento obtido está expresso na **Figura 3.6**, esta revela o aumento da resposta do biossensor até 1,8% (p/v) de gelatina na mistura, sendo decrescente entre 1,8% (p/v) (gelatina a 15%) e 3,5% (p/v) (gelatina a 30%) de gelatina na mistura. Para valores de concentração de gelatina superiores a 3,5% (p/v) a resposta do biossensor atinge um patamar a partir do qual um aumento de concentração de gelatina na

mistura não produz qualquer efeito na resposta do biossensor. O aumento da resposta do biossensor com o aumento da concentração de gelatina entre 0 e 1,8% (p/v) poderá ser justificado pelo aumento do número de ligações cruzadas na camada imobilizada sobre a membrana, conduzindo a uma maior resistência física desta camada, e portanto, maior resistência à abrasão mecânica e aos fenómenos de lixiviação da enzima durante a lavagem da membrana. O decréscimo na resposta do biossensor, decorrente do aumento da quantidade de gelatina para valores superiores a 1,8% (p/v), pode estar relacionado com três factores, em primeiro lugar o óbvio aumento da espessura da camada imobilizada, conduzindo a uma difusão mais lenta do substrato para o seu interior.

A presença das moléculas de gelatina pode conduzir a impedimentos estereoquímicos, tornando os centros activos das moléculas da enzima menos acessíveis ao substrato. Por outro lado, uma maior proporção de moléculas de gelatina significa que esta vai “competir” com a amidase presente no extracto celular pela ligação com o agente bifuncional, bem como com a superfície da membrana, tornando assim o processo de imobilização do extracto celular menos eficiente. O patamar entretanto atingido para concentrações superiores de gelatina é justificável pela saturação das ligações cruzadas, ou seja, estamos perante uma situação de excesso de reagente, em que o aumento de moléculas de gelatina na mistura não significa necessariamente um aumento de moléculas de gelatina imobilizadas. Deste modo estabeleceu-se a concentração de gelatina a utilizar em 1,8% (p/v) (gelatina a 15%).

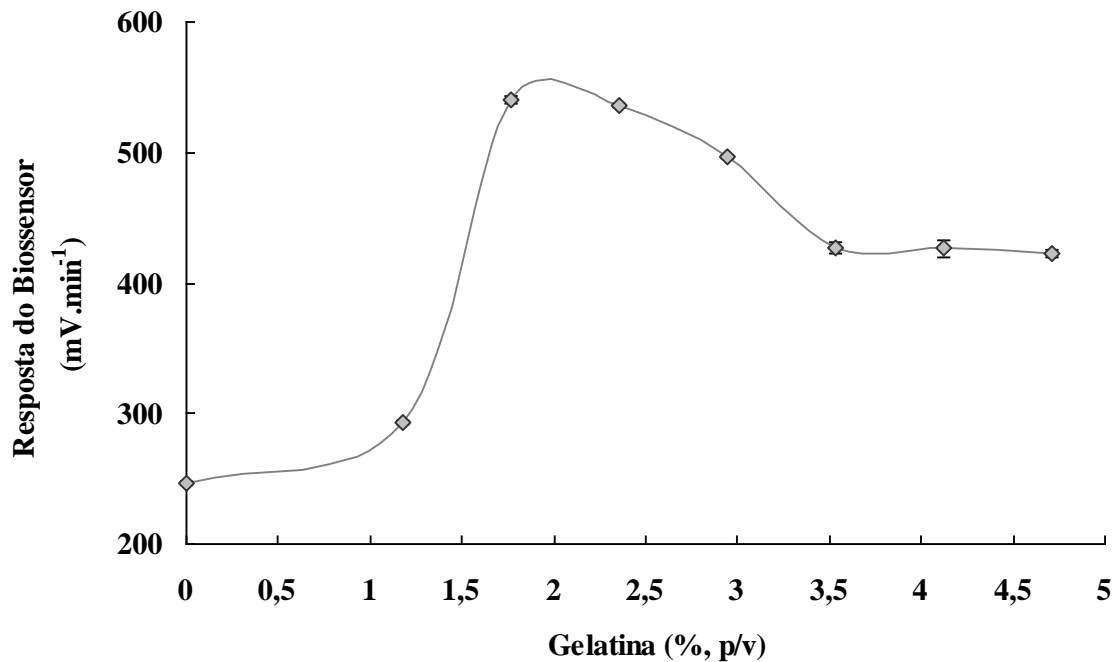


Figura 3.8 – Influência da quantidade de Gelatina na resposta do biossensor dada em termos de velocidade inicial da reacção. De acordo com o descrito em 2.3.6.2. Todos os ensaios foram realizados em triplicado estando representada a barra de erros.

3.3.3.3 *Optimização da quantidade de enzima:*

A quantidade de enzima influencia drasticamente o limite inferior e o limite superior de detecção de um biossensor [Sotiropoulou e Chaniotakis, 2005]. A maior sensibilidade a inibidores foi determinada para membranas contendo menor conteúdo enzimático [Amine *et al.*, 2006; Mohammadi *et al.*, 2005]. De modo a atingir o limite de detecção mais baixo possível a quantidade de enzima a ser utilizada deverá ser mínima. Sob estas condições, a inibição observada aumenta [Sotiropoulou e Chaniotakis, 2005; Ciucu *et al.*, 2003].

A optimização deste passo é assim de maior importância durante o desenvolvimento do biossensor. Por outro lado, deverá existir a preocupação de manter o alcance linear da resposta suficientemente elevado de modo a satisfazer o alcance analítico pretendido. Para quantidades muito baixas de enzima espera-se que o limite de detecção seja também bastante baixo. No entanto a reprodutibilidade do procedimento de imobilização para quantidades tão baixas de enzima pode não ser o mais adequado. O estudo foi realizado de acordo com o descrito em 2.2.6.3.

Tal como seria de esperar, a resposta do biossensor em termos de velocidade inicial da reacção ($\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$) aumenta com a quantidade de extracto celular utilizado no processo de imobilização. Este comportamento observa-se até se atingir um patamar para o qual a resposta é máxima e constante qualquer que seja o acréscimo de extracto na mistura.

Esta observação é justificada pelo facto de o sistema imobilizante utilizado possuir uma capacidade máxima, ou seja, quantidades de extracto mais elevadas na mistura não significam maiores quantidades de extracto, e consequentemente de enzima, imobilizadas sobre a membrana, pois atinge-se a saturação das ligações cruzadas disponíveis. A escolha da quantidade de enzima a aplicar no processo de imobilização deverá ter em conta não somente a resposta do biossensor, que se pretende máxima para concentrações saturantes de substrato, como também os limites máximo e mínimo de detecção de ureia que se pretendem determinar.

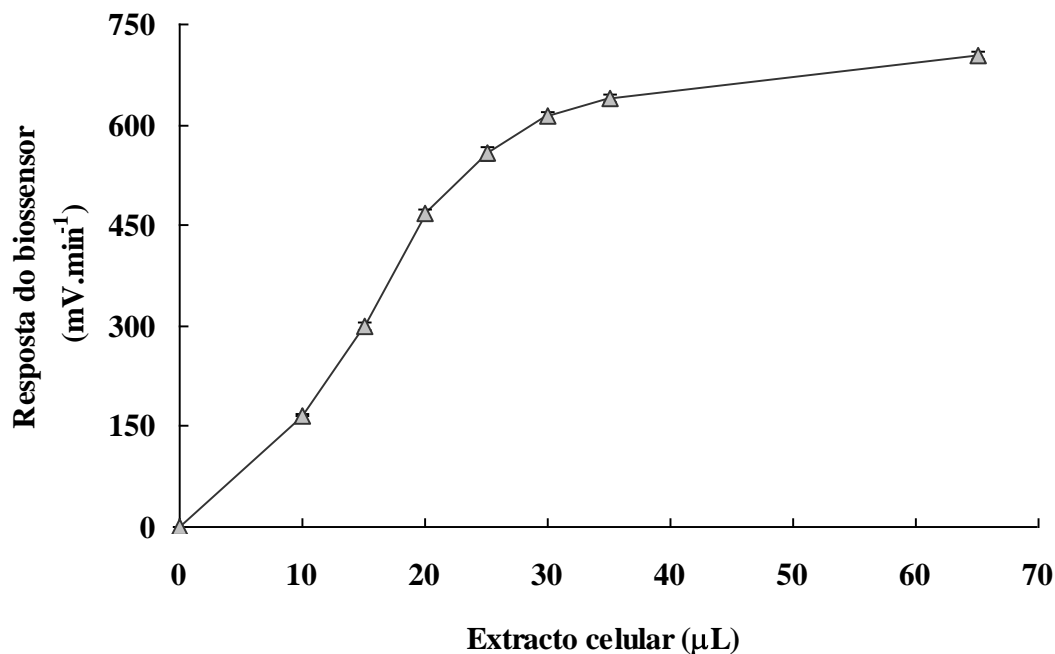


Figura 3.9 – Influência da quantidade de Extracto na resposta do biossensor dada em termos de velocidade inicial da reacção. De acordo com o descrito em 2.3.6.3. Todos os ensaios foram realizados em triplicado estando representada a barra de erros.

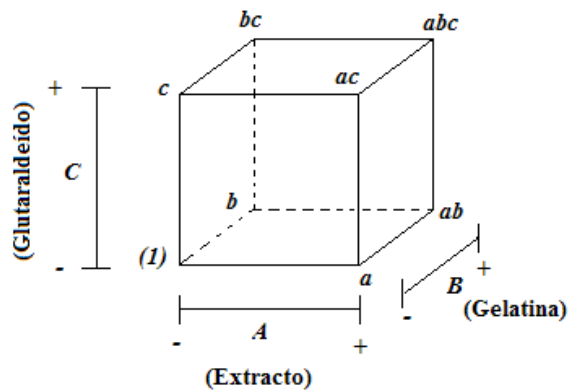
Menores quantidades de enzima conduzem a uma maior sensibilidade do biossensor para o inibidor, podendo no entanto colocar-se em causa a reprodutibilidade dos ensaios e o alcance analítico pretendido. Deste modo estabeleceu-se o intervalo entre 25 - 30 μL de extracto como o mais adequado para prosseguir o estudo.

3.3.3.4 Design Experimental:

Efectuado o estudo preliminar de optimização e escolhidos os níveis dos parâmetros efectuou-se o design experimental (2^k com $k=3$ factores e dois níveis) de acordo com a **tabela 3.1** e a **tabela 3.2**. torna-se necessário perceber qual a relação que existe entre os intervenientes no processo de imobilização e qual a influência que cada um dos intervenientes tem isoladamente sobre a resposta do biossensor. O estudo foi efectuado de acordo com o descrito em 2.2.2.4 e os resultados tratados pela metodologia ANOVA [Montgomery, (2005)].

	Níveis	
(%) Gelatina	15	-
	20	+
Volume de extracto celular (µL)	25	-
	30	+
Volume de GA (5%) µL	2	-
	4	+

Tabela3.1 – Níveis dos parâmetros seleccionados, para a realização do estudo conjugado dos diversos parâmetros optimizados: + representa nível alto e - representa nível baixo.



(A) Geometria do Design

Ext. Cel. (A)	Gel. (B)	GA (C)
-	-	-
+	-	-
-	+	-
+	+	-
-	-	+
+	-	+
-	+	+
+	+	+

(B) Matriz de teste

Figura 3.6 – Design factorial 2^3 .

	Efeito Factorial							
	I	A	B	AB	C	AC	BC	ABC
<i>(I)</i>	+	-	-	+	-	+	+	-
<i>a</i>	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>b</i>	+	-	+	-	-	+	-	+
<i>ab</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>c</i>	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>ac</i>	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>bc</i>	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>abc</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabela3.2 – Sinais para os efeitos no Design 2³.

Determinados os efeitos [Montgomery, (2005)] e aplicando o modelo de primeira ordem:

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_A x_A + \beta_B x_B + \beta_C x_C + \beta_{AB} x_A x_B + \beta_{AC} x_A x_C$$

$$\hat{y} = \beta_0 + \frac{\text{efeito}_A}{2} x_A + \frac{\text{efeito}_B}{2} x_B + \frac{\text{efeito}_C}{2} x_C + \frac{\text{efeito}_{AB}}{2} x_A x_B + \frac{\text{efeito}_{AC}}{2} x_A x_C$$

Em que β_0 é a média global das respostas obtidas para as diversas combinações.

[Montgomery, (2005)]. Foi obtido o modelo de primeira ordem para as interacções:

$$\hat{y} = 664,58 + \frac{376,01}{2} x_A - \frac{83,90}{2} x_B - \frac{42,86}{2} x_C - \frac{105,42}{2} x_A x_B - \frac{76,61}{2} x_A x_C$$

Testando o modelo no intervalo [-1,+1] obtêm-se os gráficos de superfície tridimensionais para as interacções extracto celular/GA e extracto celular/gelatina, os quais nos permitem compreender de que modo estes parâmetros se inter-relacionam.

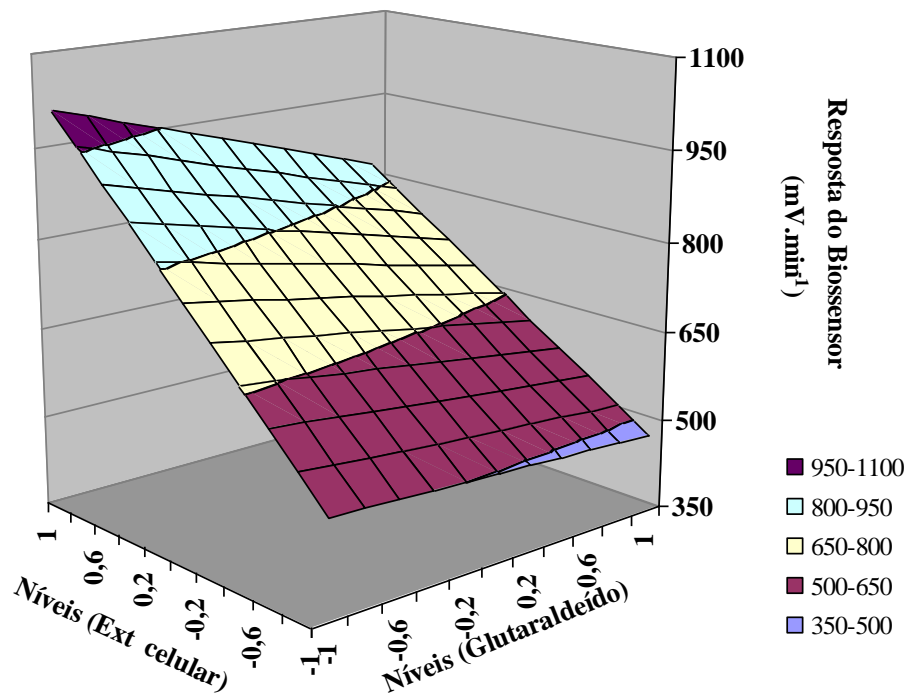


Figura 3.10 – Gráfico de superfície tridimensional para a interacção extracto celular/glutaraldeído utilizando a gelatina no nível mais baixo (15%). Onde a variável de resposta é a resposta do Biossensor em $\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$.

As **Figuras 3.10** e **3.11** mostram nitidamente a influência dos factores optimizados na resposta do biossensor. Regra geral, menores quantidades de gelatina e de glutaraldeído fornecem melhores respostas. Tal como seria de esperar, o parâmetro que demonstra ter maior influência na resposta do biossensor é a quantidade de extracto celular utilizada dado que a resposta é dada em termos de actividade da enzima presente na membrana, seguida pela quantidade de glutaraldeído e em último pela quantidade de gelatina. Deste modo optou-se por se utilizar $30\mu\text{L}$ de extracto celular, $2\mu\text{L}$ de GA 5% e $10\mu\text{L}$ de gelatina a 15% (p/v) nos ensaios subsequentes.

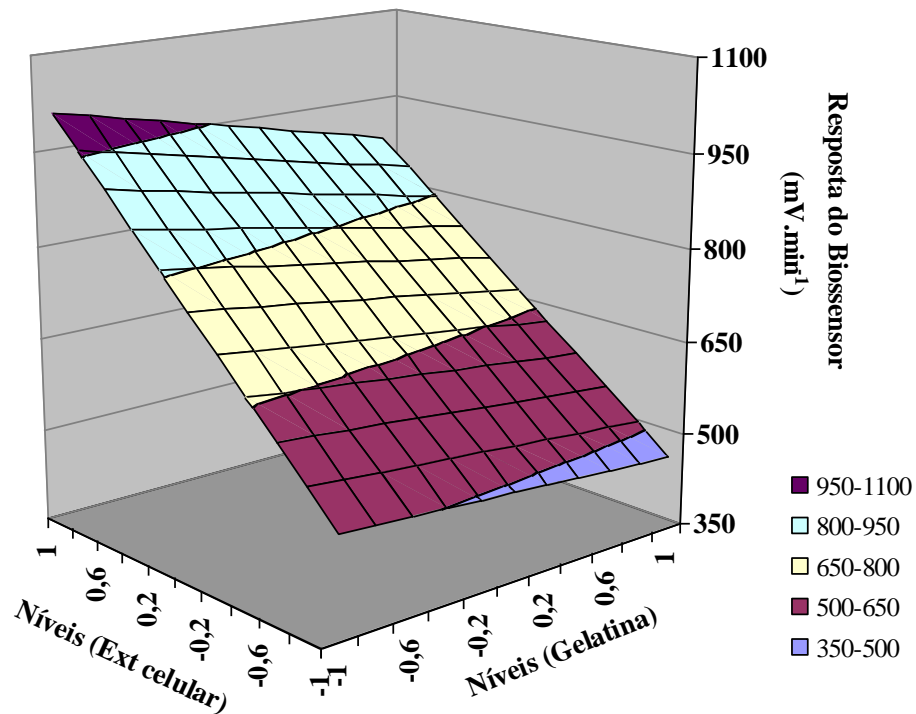


Figura 3.11 – Gráfico de superfície tridimensional para a interacção extracto celular/gelatina, utilizando o glutaraldeído no nível mais baixo (2 μ l). Onde a variável de resposta é a resposta do biossensor em $\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.3.4 Optimização de algumas condições de ensaio

3.3.4.1 Optimização do pH

Avaliou-se a influência do pH (4,5 - 8,5) na resposta do biossensor para o substrato em termos de velocidade inicial da reacção ($\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$). O estudo da influência do pH da solução de substrato para a enzima livre e imobilizado está expresso na **Figura 3.12**. Em ambos os casos é nítida a influência do pH na resposta do biossensor, sendo idêntico o comportamento observado para a enzima livre e imobilizado. No entanto em comparação com a enzima imobilizada, a actividade enzimática da enzima livre é mais afectada pela variação do pH, demonstrando uma maior variação de actividade da enzima por variações no pH. Uma justificação para este resultado poderá estar relacionada com o facto de na

camada imobilizada a enzima se encontrar mais protegido à desnaturação. Esta protecção é fornecida tanto pelo ambiente que rodeia a enzima, protegido pelas moléculas de gelatina, como pelas ligações que as suas moléculas apresentam com o GA, através dos seu resíduos amino (-NH₂). Deste modo, a influência do pH sobre a carga dos aminoácidos que constituem a cadeia polipeptídica da enzima, e conseqüentemente sobre a sua estrutura terciária, é atenuada quando comparada com a enzima livre. O extracto livre e imobilizado apresentam uma gama de pH óptimo entre 6,5 – 8 e entre 6,5 – 8,5 respectivamente, valores que não se afastam grandemente do valor de pH óptimo descrito em literatura para a Amidase pura 7 – 7,5. O valor em bibliografia foi obtido espectrofotometricamente pelo método enzimático acoplado com a glutamato desidrogenase (GDH). [Karmali *et al.*; 2001] O autor utilizou enzima purificada e um método distintamente diferente do aplicado no presente trabalho factores que podem ter conduzido à diferença observada para os valores de pH óptimo de ensaio.

Para a escolha do pH de trabalho é aconselhável escolher um limite máximo e mínimo de pH, dentro do qual não se observe alteração significativa da actividade enzimática, não interferindo deste modo com os resultados obtidos relativamente à inibição da enzima pelo inibidor. [Amine *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2002]

Deste modo optou-se por prosseguir os ensaios em tampão Tris 20mM pH 7,2, dado ser o valor que apresenta maior reposta do biossensor para a enzima imobilizada e por se encontrar dentro da gama de pH óptimo descrito em literatura para a amidase 7 – 7,5. [Karmali *et al.*; 2001].

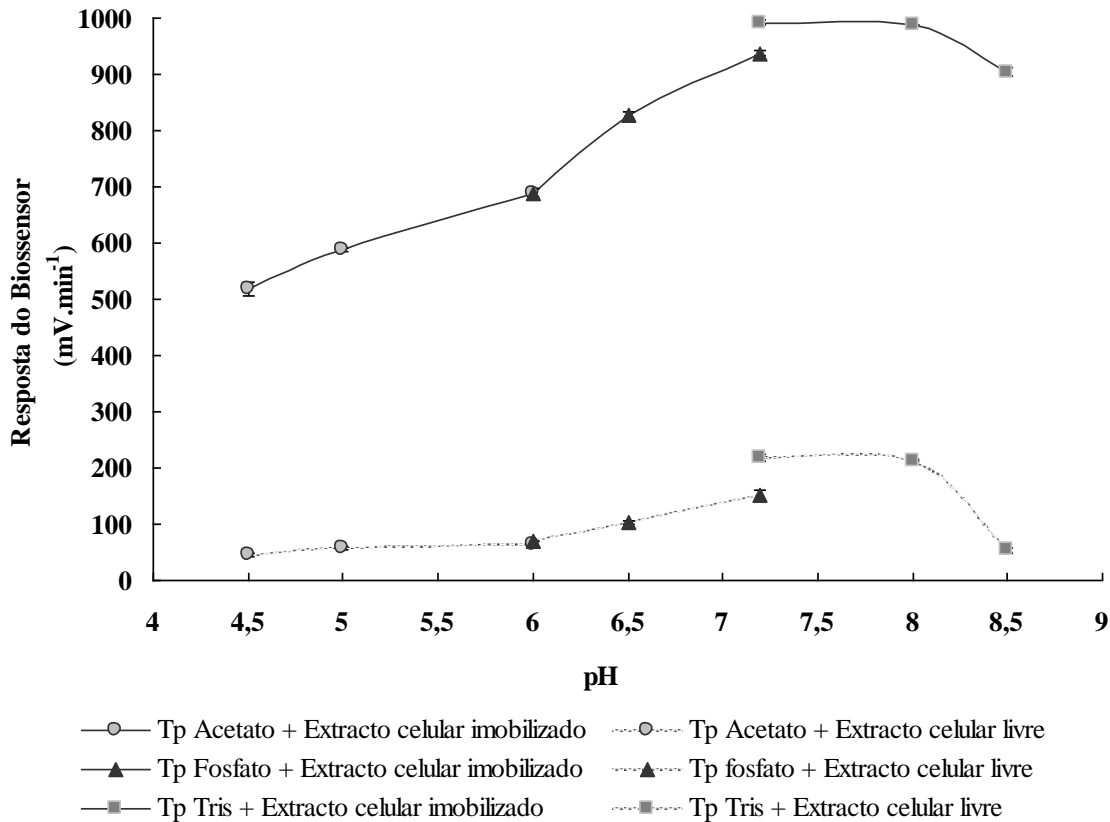
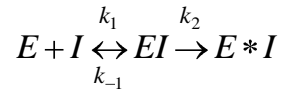


Figura 3.12 – Influência do pH na resposta do biossensor e na resposta potenciométrica para a enzima livre, dada em termos de velocidade inicial da reacção. Imobilizou-se 65 μ L de uma mistura contendo 2 μ L de GA 5% + 10 μ L Gelatina 15% (p/v)+ 30 μ L de extracto celular (6090,6 UB.mL⁻¹), perfazendo o volume final de 85 μ L de mistura com TMEGB, por membrana (PES). Os tampões utilizados foram: Tampão Acetatos 20mM a pH= 4,5; 5 e 6. Tampão Fosfatos 20mM a pH= 6; 6,5 e 7,2. Tampão Tris 20mM a pH=7,2; 8 e 8,5. Todos os ensaios forma efectuados em triplicado estando representada a barra de erros

3.3.4.2 Optimização do tempo de incubação em ureia

A ureia é um inibidor do centro activo da amidase de *Pseudomonas aeruginosa*, a ligação da amidase com a ureia restringe a titrabilidade dos grupos SH a 6 por molécula hexamérica e protege-a contra a desnaturação térmica sugerindo que a ligação com a ureia provoca uma alteração conformacional na enzima. A mutação em duas regiões da enzima, substituindo-se os resíduos Arg-188 e Trp-144, conduziu à obtenção de uma amidase que não se liga à ureia, pelo que estes resíduos se encontram envolvidos no

mecanismo de ligação da ureia à amidase. A ureia e seus análogos são inibidores (I) do centro activo da amidase (E), sendo o mecanismo de inibição dependente do tempo, de acordo com a seguinte reacção:



A formação do complexo EI é rapidamente reversível enquanto que E*I é inactivo e não recupera actividade rapidamente. Gregoriou e Brown descobriram que neste complexo somente uma molécula de ureia se liga por cada molécula de enzima [Tata *et al.*, **1994**; Gregoriou e Brown, **1979**]. A possibilidade de que a ureia sofra uma modificação química totalmente reversível após interacção com a enzima, envolvendo a formação de um intermediário que actue como o verdadeiro inibidor não pode ser totalmente descartada [Gregoriou e Brown, **1979**]. Estudos realizados por Gregoriou e Brown (1979) revelaram que, quando juntas em solução, a acetamida protege a amidase contra a inactivação pela ureia, sugerindo um mecanismo de inibição competitiva em que a amidase compete com a acetamida pelo centro activo da enzima [Gregoriou e Brown, **1979**]. Dada a grande dependência do tipo e nível de inibição da amidase pela ureia com o tempo, a optimização do tempo de incubação do sistema nas soluções de ureia é de extrema importância. Deste depende grandemente a sensibilidade do biossensor e conseqüentemente o sucesso do presente método de detecção da ureia. O nível de inibição foi calculado como o decréscimo relativo da resposta do biossensor, em termos de velocidade inicial da reacção Δv (%) na presença do inibidor após um determinado período de tempo. A velocidade da reacção v é dada em $\text{mV} \cdot \text{min}^{-1}$ pelo declive da recta de progresso da reacção em 4 mL de acetamida 0,1M em tampão Tris pH 7,2 e corresponde à actividade da enzima imobilizado nas condições de ensaio. Os valores são determinados de acordo com a expressão:

$$\Delta v\% = \frac{v_1 - v_2}{v_1} \times 100$$

Onde v_1 é a velocidade da reacção antes de incubar a membrana na solução contendo ureia e v_2 a velocidade da reacção após se incubar a membrana durante um determinado

período de tempo (tempo de incubação) na solução contendo o inibidor [Campanella *et al* 2005; Stoytcheva 2002; Ivanov *et al* 2003; Campanella *et al* 2007; Joshi *et al* 2005; Kok *et al* 2002; Gulla *et al* 2002; Shan *et al* 2004; Sotiropoulou e Fournier, 2005].

O grau de inibição depende da concentração de inibidor e do tempo de exposição a esse inibidor. Quando ocorrem fenómenos de difusão o modelo prevê que a percentagem de inibição da enzima (%), após exposição ao inibidor, está linearmente relacionada com a concentração de inibidor [I] e a raiz quadrada do tempo de incubação ($t^{1/2}$)

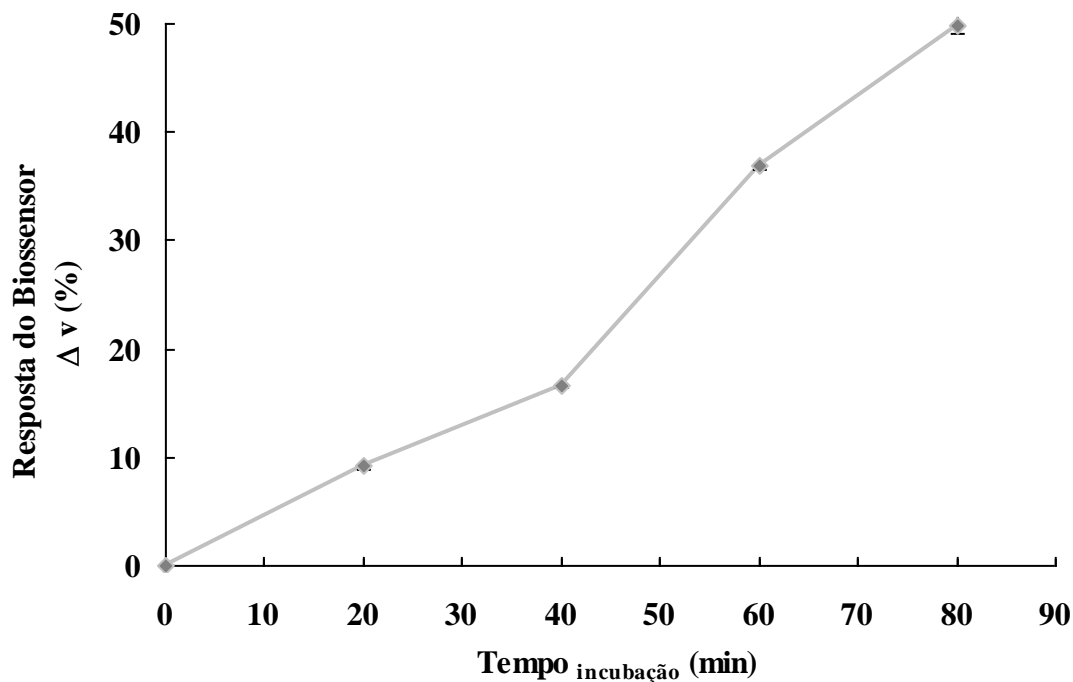


Figura 3.13 – Influência do tempo de incubação numa solução de 2 μ M de ureia preparada em Tp Tris 20mM pH 7,2 na resposta do biossensor. Método de imobilização idêntico ao descrito na **Figura 3.12**. Os dados referem-se à diferença de velocidade da reacção observada antes e após incubação das membranas em ureia.

O estudo efectuado revelou nitidamente o aumento do nível de inibição com o aumento do tempo de incubação das membranas em ureia, não se observando no entanto uma relação linear entre tempo de incubação e nível de inibição. Na tentativa de reduzir o limite de detecção do biossensor de 2 μ M ureia para valores inferiores optou-se por se escolher um tempo de incubação superior ao tempo mínimo necessário para se observar 10% de decréscimo da resposta do biossensor 20 min. Deste modo optou-se por se prosseguir os ensaios recorrendo a um tempo de incubação de 35 min.

3.3.5 Características analíticas do biossensor

3.3.5.1 Curva de calibração para a ureia no vinho

Optimizados os parâmetros de ensaio (pH e tempo de incubação) e o sistema de imobilização, obteve-se a curva de calibração para a ureia numa solução de vinho caseiro de acordo com o descrito em 2.2.9:

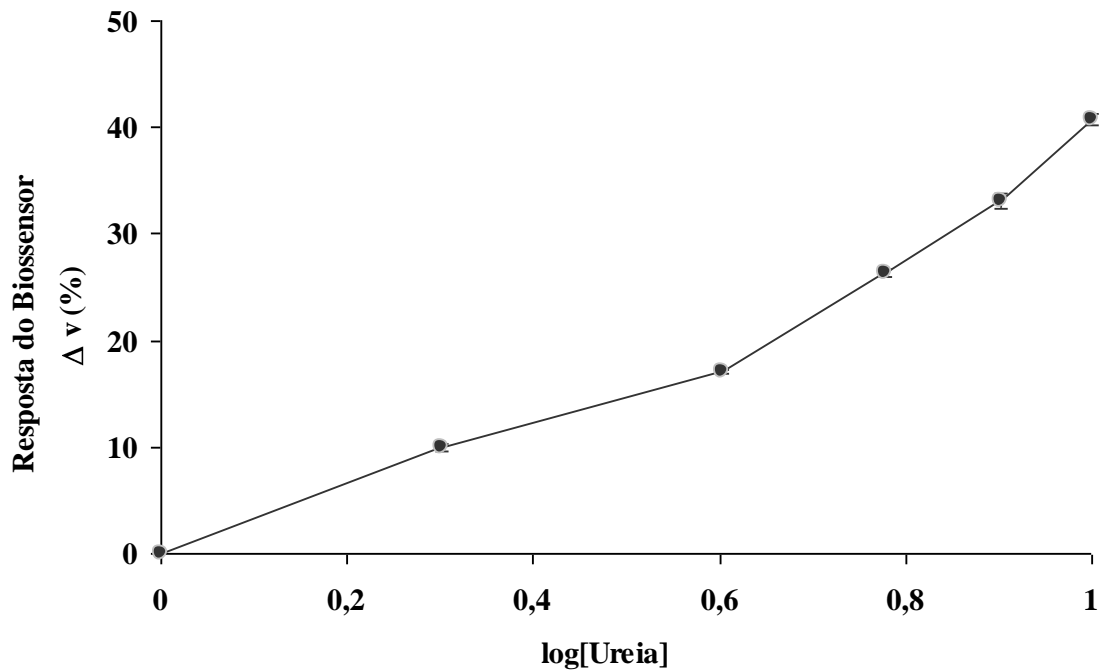


Figura 3.14 – Curva de calibração para a ureia após 35min de incubação das membranas em soluções contendo 2, 4, 6, 8 e 10 μM de ureia, preparadas num vinho caseiro. Processo de imobilização idêntico ao descrito na **Figura 3.12**. As leituras, antes e após incubação das membranas nas soluções de ureia, foram efectuadas em tampão tris 20mM pH=7,2. Ensaio decorreram à temperatura ambiente.

3.3.5.2 Zona linear da curva de calibração

Tal como se pode observar pela **Figura 3.15** o biossensor apresenta uma resposta linear no intervalo de concentrações de ureia compreendido entre 4 e 10 μ M. Para N=4 a equação obtida foi: $\Delta v(\%) = 58,2 \log [\text{Ureia}] - 18,5$ obtendo-se um coeficiente de correlação angular $R^2=0,99$, com Δv em $\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$ e [Ureia] em μM . [Mohammadi *et al* 2005; Thévenot *et al.*, 1999].

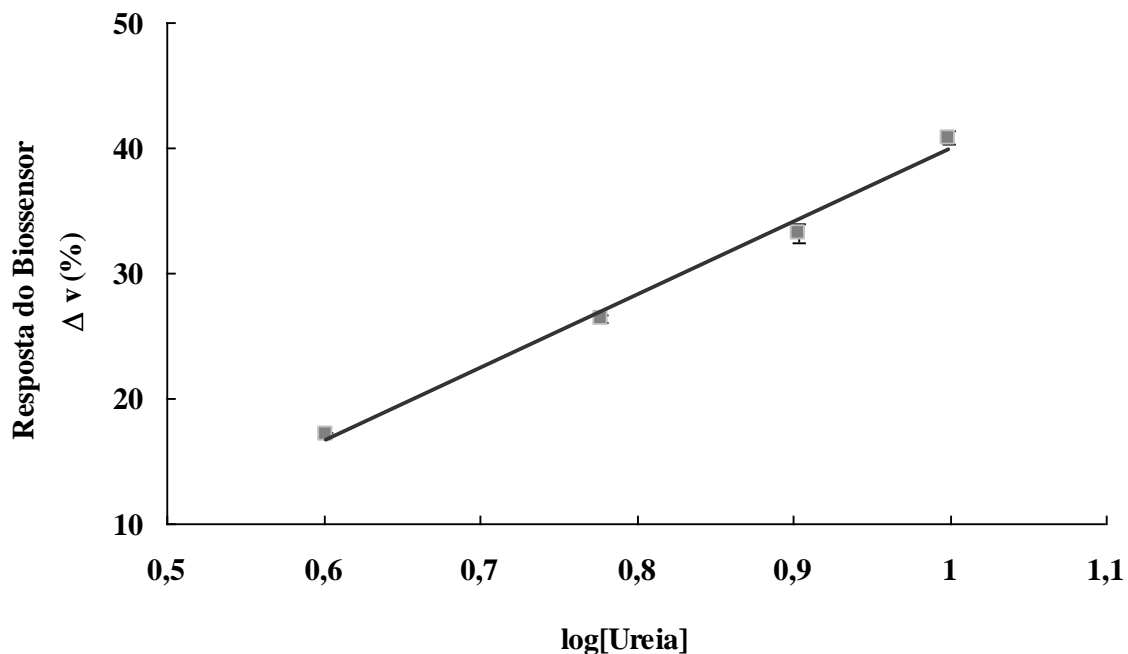


Figura 3.15 – Zona linear da curva de calibração para a ureia após 35min de incubação das membranas em soluções contendo 2, 4, 6, 8 e 10 μM de ureia, preparadas num vinho caseiro. Método de imobilização idêntico ao descrito na **Figura 3.12**. As leituras, antes e após incubação das membranas nas soluções de ureia, foram efectuadas em tampão tris 20mM pH=7,2. Ensaios decorreram à temperatura ambiente.

3.3.5.3 Sensibilidade

Para o presente biossensor as medições são baseadas na sua resposta dinâmica. Neste caso a sensibilidade é definida como a variação de sinal com o tempo para uma dada variação de concentração. A sensibilidade é definida como o declive da curva de calibração do biossensor, ou seja, resposta do biossensor versus concentração ou

logaritmo da concentração [Thévenot *et al.*, 1999]. Deste modo a sensibilidade do presente biossensor é de 58,2 mV.min⁻¹, de acordo com a equação:

$$\Delta v_{60} = 58,2 \log [Ureia] - 18,5$$

3.3.5.4 Tempo de resposta

O tempo de resposta do biossensor corresponde ao tempo necessário para que este atinja 90% da resposta total. Para o presente trabalho o tempo de resposta corresponde a 20 segundos.

3.3.5.5 Limite de detecção

O limite de detecção foi definido como a concentração de ureia requerida para obter um nível de inibição de 10% [Amine *et al.*, 2006][Mohammadi *et al.*, 2005]. Considerando a recta de calibração obtida experimentalmente obteve-se um limite de detecção de 2 µM de ureia.

3.3.5.6 Estudo da estabilidade do biossensor

O tampão TMEGB possui glicerol que é um agente hidrófilo que estabiliza as ligações de hidrogénio, β-mercaptoetanol que é um agente redutor mantendo os grupos SH na forma reduzida e EDTA apresenta propriedades quelantes removendo metais pesados que possam provocar a oxidação dos grupos tióis. Estas características possibilitam a manutenção da actividade catalítica da enzima amidase por períodos mais prolongados de tempo tendo sido este o sistema de armazenamento utilizado no presente trabalho para o estudo das estabilidade do biossensor e determinação do seu tempo de meia vida, de acordo com o descrito em 2.2.10.

Os resultados obtidos estão expressos na figura **Figura 3.16**. O biossensor foi estável por um período superior a 55 dias.

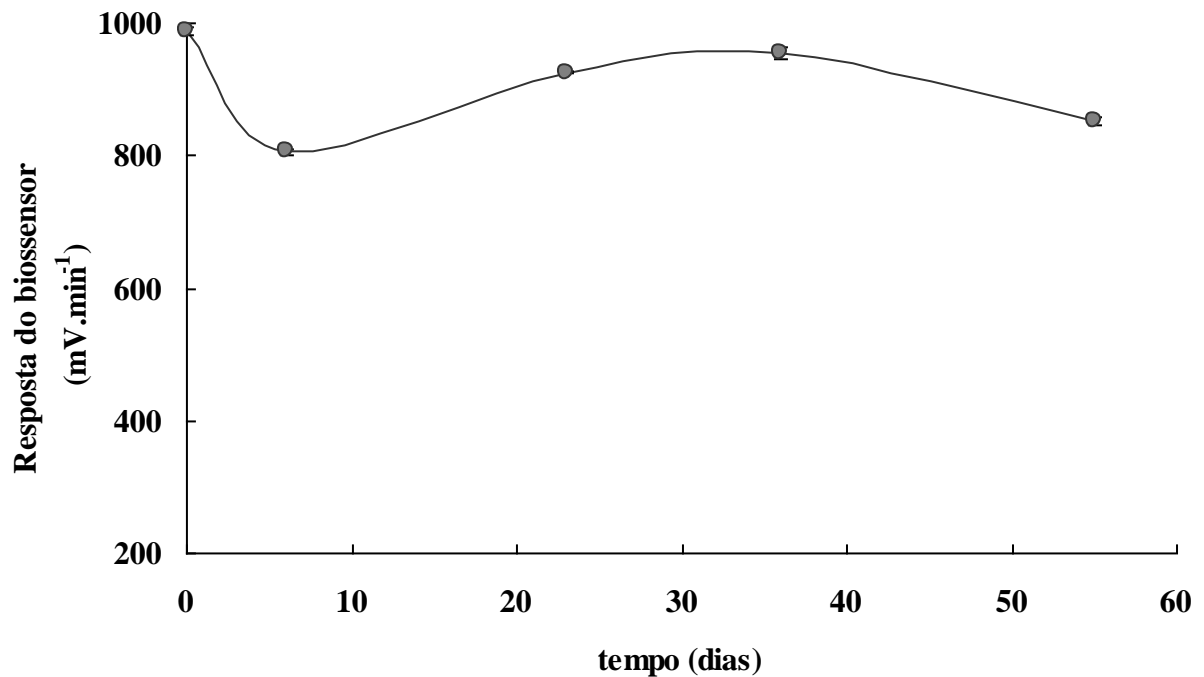


Figura 3.16 – Estudo da estabilidade do biossensor de acordo com 2.3.13. Todos os ensaios foram efectuados em triplicado, estando representada a barra de erros.

3.3.6 Estudo da regeneração do biossensor

A incubação das membranas após inibição em 2M hidroxilamina por um período de 2 horas permitiu a recuperação de 70% da actividade inicial da enzima **Figura 3.17**.

Este resultado sugere a necessidade de experiências adicionais no sentido de otimizar a reactivação da amidase, quer jogando com o tempo de incubação quer com o pH e concentração de hidroxilamina.

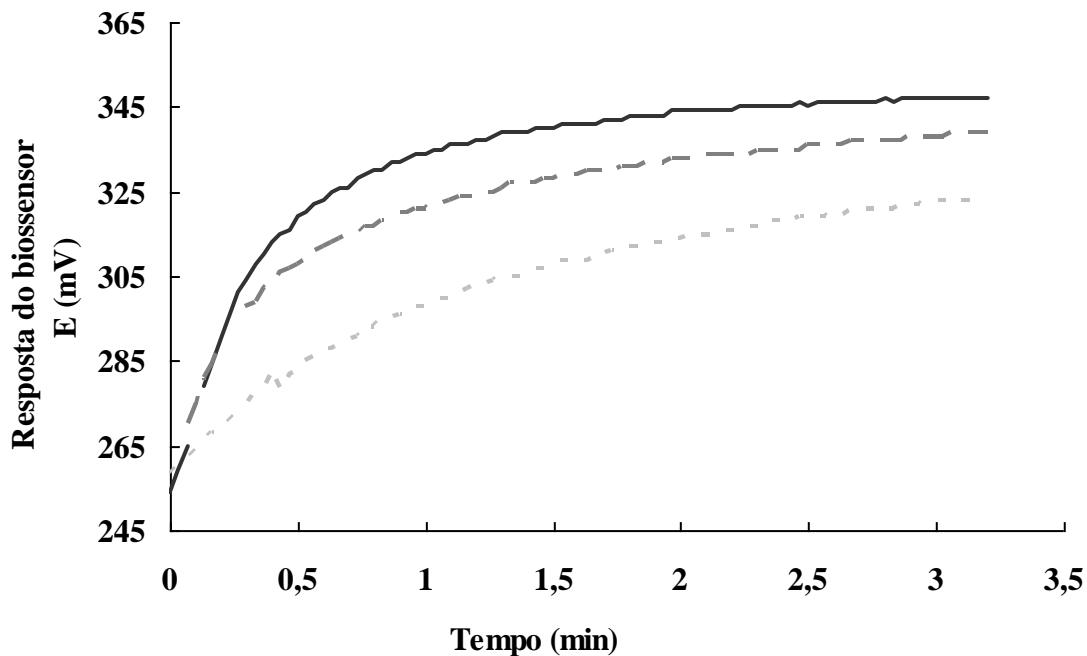


Figura 3.17 – Estudo da reactivação do biossensor por incubação das membranas em hidroxilamina 2M por um período de 2h. Onde: — Resposta inicial do biossensor; - - - Resposta do biossensor após incubação na solução de ureia; - - - Resposta do biossensor após regeneração por incubação em hidroxilamina 2M.

O presente método reúne um bom tempo de resposta (20s), boa estabilidade de armazenamento (55 dias), alcance linear (4-10 μ M), limite de detecção (2 μ M) e sensibilidade quando comparado com outros métodos enzimáticos para a determinação de ureia em diversos analitos. Destes realce-se os trabalhos desenvolvidos por Shrivastava *et al.* (2001), estes autores desenvolveram um biossensor para a determinação de ureia no sangue, baseado no método potenciométrico e imobilização da urease por encapsulação numa matriz de gelatina, este biossensor apresenta uma maior estabilidade de armazenamento, traduzida pelo $t_{1/2}$ =240 dias, no entanto o limite de detecção é nitidamente superior 5mg.dl⁻¹ ao obtido no presente trabalho. Inúmeros exemplos de métodos enzimáticos para a determinação de ureia com recurso a biossensores podem ser referidos. No entanto, todos estes métodos apresentam vantagens e desvantagens em relação ao método desenvolvido no presente trabalho. [Singh *et al.*, 2008]

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES

E

PERSPECTIVAS FUTURAS

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS:

Desenvolveu-se um novo método enzimático de determinação de ureia baseado na inibição enzimática da amidase presente no extracto celular de *Pseudomonas aeruginosa* L10. O método revelou ser bastante simples, selectivo e sensível ao analito.

O seu desenvolvimento consistiu na imobilização covalente de extractos celulares, contendo actividade catalítica de amidase de *Pseudomonas aeruginosa*, sobre membranas de poliétersulfona e posterior acoplamento destas membranas em contacto directo com a superfície de um eléctrodo selectivo de iões amónio.

O método mais adequado de imobilização demonstrou ser o de ligações cruzadas com recurso ao GA como agente bifuncional e gelatina.

O estudo de optimização dos parâmetros intervenientes na imobilização bem como de alguns parâmetros de ensaio permitiram a obtenção de um biossensor para a ureia no vinho com uma sensibilidade de $58 \text{ mV} \cdot \text{min}^{-1}$, apresentando um tempo de resposta de aproximadamente 20s, revelou ainda elevada estabilidade de armazenamento sendo superior a 55 dias. A resposta do biossensor mostrou-se linear para concentrações de ureia presentes no vinho na gama de 4-10 μM de ureia. Todos os métodos enzimáticos de determinação de ureia apresentam algumas vantagens e desvantagens, o presente método reúne um bom tempo de resposta, boa estabilidade de armazenamento e sensibilidade quando comparado com outros métodos enzimáticos para a determinação de ureia.

O pH óptimo da enzima imobilizada demonstrou encontrar-se entre pH 7,2 e 8.

Dadas as características do método desenvolvido torna-se imprescindível a validação dos resultados obtidos para a determinação da ureia em amostras reais de vinho. O extracto celular utilizado é uma mistura complexa, podendo apresentar outras enzimas que conduzam a reacções paralelas interferindo na análise. Deste modo os resultados deverão posteriormente ser validados com outros métodos conhecidos de quantificação de ureia, como seja a aplicação de biossensores construídos com a urease, espectrofotometria de infravermelho (IV) ou ainda métodos colorimétricos.

Estudos posteriores poderão ser efectuados no sentido de se obter limites de detecção mais baixos. O presente biossensor para a ureia baseado no processo de inibição enzimática poderá ser adaptado a um sistema de ISFET permitindo o emprego de

quantidades mínimas de enzima e conseqüente aumento da sensibilidade e redução do limite de detecção.

CAPÍTULO 5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad, J.M., Pariente, F., hernandez, L., Abruna, H.D., Lorenzo, E., (1998). Determination of organophosphorous and carbamate pesticides using a piezoelectronic biosensors. *Anal. Chem.* **70**, 2848-2855

Almy, J.; Ough, C.S.; (1989). Urea analysis for wines. *J. Agric. Food Chem.*,**37**, 968-970

Ambler, R.P.; Auffret, A.D.; Clarke, P.H.; (1987). The aminoacid sequence of the alifatic amidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Elsevier*, **215** (2), 285-290

Amine, A.; Mohammadi, H.; Bourais, I.; Palleschi, G.; (2006). Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 1405-1423

Andrade, J.; Karmali, A.; Carrondo, M.A.; Frazão, C.; (2007). Structure of Amidase from *Pseudomonas aeruginosa* Showing a Trapped Acyl Transfer Reaction Intermediate State. *The Journal of Biological Chemistry*, **282** (27), 19598-19605

Bedino, J. H.; (2003). Embalming Chemistry: Glutaraldehyde versus Formaldehyde. *Expanding Encyclopedia of Mortuary Practices*, **649**, 2614-2632

Betancor, L.; López-Gallego, F.; Alonso-Morales, N.; Dellamora, G.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M.; Glutaraldehyde in protein immobilization: A versatile reagent. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, 2nd Edition

Bickerstaff, G.F.; (1995). Impact of genetic technology on enzyme technology. *Genet. Engineer Biotechnologist*, **15**, 13-30.

Bickerstaff, G.F.; (1997). *Immobilization of Enzymes and Cells*; Humana Press; New Jersey.

Bradford, M.M.; (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Brodelius, P.; (1985). Immobilized plant cells, in *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology* (Laskin, A.I.,ed.) Benjamin Cummings, London, 109-148

Brenner, C.;(2002). Catalysis in the Nitrilase Superfamily. *Current opinion in structural biology*, **12**, 775-782.

Brown, P.R.; Smyth; M.J.; Clarke, P.H.; Rosemeyer, M.A.; (1973). The Subunit Structure of Aliphatic Amidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. Che. Biochem.* **34**, 177 – 187

Brown, P.R.; Gregoriou, M.; Tata, R.; (1978). Relationship between mutant amidases of *Pseudomonas aeruginosa* and hydroxyurea as an inhibitor. *Molec. gen. Genet.* **165**, 213-219.

Brown, P.R.; Gregoriou, M.; (1979). Inhibition of the aliphatic amidase from *Pseudomonas aeruginosa* by Urea and related compounds. *Eur. J. Biochem.*, **96**, 101-108.

Brycki, B.; Domka, F.; Seifert, K.; Szymanska, K.; (2001). The Effect of Glutaraldehyde on the Kinetics of Selected Microbiological Processes. *Polish Journal of Environmental Studies*, Vol. **11**, N°1, 17-21

Buerk, D.G.; (1993). Biosensors, theory and applications. Technomic publishing co., Inc., Lancaster Basel.

Bucke, C.; (1983). Immobilized cells. *Phil. Trans. R. Soc. B* **300**, 369-389.

Butler, W.R.; Calaman, J.J.; Beam, S.W.; (1996). Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **74**, 858-865.

Butzke, C.E.; Bisson, L.F. Ethyl Carbamate preventive action manual. U. S. FDA. Center for Food safety and Applied Nutrition. <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/ecaction.html> (accedido em Julho 2008)

Cabral, J.M.S; Aires-Barros, M.R.; Gama, M.; (2003). Engenharia Enzimática., LIDEL editoras, Lisboa.

Cabral, J.M.S. and Kennedy, J.F. (1991). Covalent and coordination immobilization of proteins, in *Proteins Immobilization* (Taylor, R. F., ed), Marcel Dekker, New York, 73-138

Campanella, L.; Bonanni, A.; Martini, E.; Todini, N.; Tomassetti, M.; (2005). Determination of triazine pesticides using a new enzyme inhibition tyrosinase OPEE operating in chloroform. *Sensors and actuators B*, **111-112**, 505-514.

Campanella, L.; Lelo, D.; Martini, E.; Tomassetti, M.; (2007). Organophosphorus and carbamate pesticide analysis using an inhibition tyrosinase organic phase enzyme sensor; comparison by butyrylcholinesterase + choline oxidase opee and application to natural waters. *Analytica Chimica Acta*, **587**, 22-32.

Chaubey, A.; Malhotra, B.D.; (2002). Mediated Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **17**, 441-456

Chebrou, H.; Bigey, F.; Arnaud, A.; Galzy, P.; (1996). Study of the amidase signature group. *Biochimica et Biophysica Acta* **1298**, 285-293.

Choi, M.M.F.; (2004). Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers. *Microchimica Acta* **148**, 107-132.

Chou, Nien Hsuan; Jung, Chuan Chou; Sun, Tai Ping; Hsiung, Shen Kan; (2008). Differential type solid-state urea biosensors based on ion-selective electrodes. *Sensors and Actuators B* **130**, 359-366.

Ciucu, A.A.; Negulescu, C.; Baldwin, R.P.; (2003). Detection of pesticides using an amperometric biosensor based on ferophthalocyanine chemically modified carbon paste electrode and immobilized bienzymatic system. *Biosensors and Bioelectronics* **18**, 303-310.

Cooper, M.; Tavankar, G. R.; Williams, H. D.; (2003). Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **149**, 1275-1284.

Cousens, D, J.; Clarke, P.H.; Drew, R.; (1987). The Amidase Regulatory Gene (amiR) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology*, **133**, 2041-2052.

DePeters, E.J.; Ferguson, J. D.; (1992). Non-Protein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *Journal of dairy Science*, **75**, 3192-3209.

Domingos, A.; Karmali, A.; Brown, P. R.; (1989). One-Step affinity purification of amidase from mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, **71**, 1179-1184

Dzyadevych, S. V.; Arkhypova, V.N.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N.; Chovelon, J.M.; El'Skaya, V.; Soldatkin, A.P.; (2004). Potentiometric biosensors based on ISFETs and immobilized cholinesterases. *Electroanalysis*, **16**, (22).

Eshkenazi, I.; Maltz, E.; Zio, B.; Rishpon, J.; (2000). A three-cascaded-enzymes biosensor to determine lactose concentration in raw milk. *J. Dairy Sci.* **83**, (9), 1939-1945.

Fersht, Alan; (1997). Structure and Mechanism in Protein Science – A guide to enzyme catalysis and protein folding. *W. H. Freeman and Company*, New York.

Francis, P.S.; (2006). The determination of urea in wine – a review. *Aust. J. Grape wine Res.*, **12**, 97-106

Garske, L.A.; Beatson, S. A.; Leech, A.J.; Walsh, S.L.; Bell, S.C.; (2004). Sub-inhibitory concentrations of ceftazidime and tobramycin reduce the quorum sensing signals of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathology*, **36(6)**, 571-575.

Gemeiner, P. (1992) Materials for enzyme engineering, in *Enzyme Engineering* (Gemeiner, P., ed.) Ellis Horwood, New York, pp. 13-119

Goldstein, L. (1976). Kinetic behaviour of immobilized enzyme systems, in *Methods in enzymology*, vol XLIV (Mosbach, K., ed.), Academic, New York, pp.397-443.

Guerrieri, A.; Monaci, L.; Quinto, M.; Palmisano, F.; (2002). A disposable amperometric biosensor for rapid screening of anticholinesterase activity in soil extracts. *Analyst*, **127**, 5-7.

Gregoriou, M.; Brown, P.R.; Tata, R.; (1977). *Pseudomonas aeruginosa* mutants resistant to urea inhibition of growth on acetanilide, **132** (2), 377-384.

Gregoriou, M.; Brown, P.R.; (1979). Inhibition of the Aliphatic Amidase from *Pseudomonas aeruginosa* by Urea and Related Compounds. *Eur. J. Biochem*, **96**, 101-108.

Groboillot, A., Boadi, D.K., Poncelot, D., and Neufeld, R.J. (1994). Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* **14**, 75-107.

Gulla, K. C.; Gouda, M.D.; Thakur, M.S.; Karanth, N.G.; (2002). Reactivation of immobilized acetyl cholinesterase in an amperometric biosensor for organophosphorous pesticide. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1597**, 133-139.

Hasnip, S.; Caputi, A.; Crews, C.; Brereton, P.; (2004). Effects of storage time and temperature on the concentration of ethyl carbamate and its precursors in wine. *Food Addit. Contam.*,**21**, 1155-1161.

Hof, G.; Vervoorn, M.D.; Leaners, P.J.; Tamminga, S.; (1997). Milk urea nitrogen as a tool to monitor the protein nutrition of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **80**, 3333-3340.

Hopwood, D.; Allen, C. R., McCabe, M.: (1970). The reactions between glutaraldehyde and various proteins. An investigation of their Kinetics. *Histochemical Journal*, **2**, 137-150.

Ivanov, A.; Evtugyn, G.; Budnikov, H.; Ricci, F.; Moscone, D.; Palleschi, G.; (2003). Cholinesterase sensors based on sreen-printed electrodes for detection of organophosphorus and carbamic pesticides. *Anal Bioanal Chem* **377**, 624-631.

James, T.; Meyer, D.; Esparza, E.; DePeters, E.J.; Pérez-Monti, H.; (1999). Effects of dietary nitrogen manipulation on ammonia volatilization from manure from holstein heifers. *Journal of Dairy Science*, **82**, 2430-2439.

Janata, J.; M. Josowicz, p. Vanysek, and D.M. DeVaney, *Anal. Chem.*, 70, R179 (1998)

Joshi, A. K.; Tang, J.; Haddon, R.; Wang, J.; Chen, W.; Mulchandani, A.; (2005). A Disposable Biosensor for Organophosphorus Nerve agents Based on Carbon Nanotubes Modified Thick Film Strip Electrode. *Electroanalysis*, **17**, N°1, 54-58.

Jonker, J.S.; Kohn, R.A.; Erdman, R.A.; (1998). Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Sciences*, **81**, 2681-2692.

Karmali, A.; Pacheco, R.; Tata, R.; Brown, P. (2001) – Substitution of Thr-103-Ile and trp-138-Gly in amidase from *Pseudomonas aeruginosa* are responsible for altered kinetic properties and enzyme instability. *Molecular Biotechnology*, **17**, 201-212.

Kauffman, A.J.; St-Pierre, N.R.; (1999). Effect of Breed and Concentrations of Dietary Crude Fiber on Milk Urea Nitrogen, Ohio State University, Department of animal Science. *Research and Reviews*, 60-65.

Kierstan, M.P.J. and Coughlan, M.P. (1991) Immobilization of proteins by noncovalent procedures: principles and applications, in *Protein Immobilization* (Taylor, R.F., ed.), Marcel Dekker, new York, pp. 13-71.

Kirchgessner, M.; Kaufmann, T.E.G.; (1987). Harnstoff und allantoin in der milch von kuhen wahrend und nach energetischer uberversorgung. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **58**, 147-156.

Kirchgessner, M.; Kreuzer, M.; Roth-Maier, D.A.; (1986). Milk urea and protein content to diagnose energy and protein malnutrition of dairy cows. *Archives of Animal Nutrition*, **36**, 192-197.

Kohn, R.; (2000). Caution Needed when interpreting MUNs. *Hoard's Dairyman*, **145**, 58.

Kok, F. N.; Bozoglu, F.; Hasirci, V.; (2002). Construction of an acetylcholinesterase-choline oxidase biosensor for aldicarb determination. *Biosensors and bioelectronics*, **17**, 531-539.

Koncki, Robert; (2007). Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. *Analytica Chimica Acta* **599**, 7-15.

Kuralay, Filiz; Ozyoruk, Haluk, Yildiz, Attila; (2005). Potentiometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film. *Sensors and actuators B* **109**, 194-199.

Larson, S.F.; Butler, W.R.; Currie, W.B.; (1997). Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **80**, 1288-1295.

Lojou, É.; Bianco, P.; (2006). Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. *J. Electroceram.* **16**, 79-91.

Luong, J.H.T; Bouvrette, P.; Male, K.B.; (1997). Development and applications of biosensors for food analysis. *Trends Biotechnol.*, **15**, 369-377.

Martins, S.; Karmali, A.; Serralheiro, M.L., (2006). Kinetic Properties of wild-type and altered recombinant amidases by the use of ion-selective electrode assay method. *Analytical Biochemistry* **355**, 232-239.

Matsudo, T.; Aoki, T.; Abe, K.; Futuka, N.; Higuchi, T.; Sasaki, M.; Uchida, K.; (1993). Determination of ethyl carbamate in soy sauce and its possible precursor. *J. Agric. Chem.*, **41**, 352-356.

Messing, R.A. (1976). “Adsorption and inorganic bridge formations” in *Methods in Enzymology* vol. XLIV (Mosback, K., ed), Academic, New York, pp. 148-169.

Minunni, M., Skladal, P., Mascini, M., (1994). A piezoelectronic quartz crystal biosensor as a direct affinity sensor. *Anal. Lett.* **27**, 1465-1487.

Mohammadi, H.; Amine, A.; Cosnier, S.; Mousty, C., (2005). Mercury-enzyme inhibition assays with an amperometric sucrose biosensor based on a trienzymatic-clay matrix. *Analytica Chimica Acta*, **543**, 143-149.

Monteiro, F.F.; Bisson, L.F. (1991). Amino acid utilization and urea formation during vinification fermentations. *Am. J. Enol Vitic.*, **42**, 199-208.

Montgomery, D. C.; (2005). Introduction to Statistical Quality Control. John Wiley & Sons, Inc., USA

Nawaz, M. S.; Chapatwala, K. D.; Wolfram, J. H.; (1989). Degradation of acetonitrile by *Pseudomonas putida*. *Applied and environmental microbiology*, 2267-2274.

Nawaz, M.S.; Chapatwala, K.D.; (1990). Simultaneous degradation of acetonitrile and biphenyl by *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* **37**; 411-418.

Neufeld, T.; Eshkenazi, I.; Cohen, E.; Rishpon, J.; (2000). A micro flow injection electrochemical biosensor for organophosphorus pesticides. *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 323-329.

Novo, C.; Tata, R.; Clemente, A.; Brown, P.R.; (1995). *Pseudomonas aeruginosa* aliphatic amidase is related to the nitrilase/cyanide hydratase enzyme family and Cys¹⁶⁶ is predicted to be the active site nucleophile of the catalytic mechanism. *FEBS Letters* **367**, 275-279.

Novo, C.; Farnaud, S.; Tata, R.; Clemente, A.; Brown, R.; (2002). Support for a three-dimensional structure predicting a Cys-Glu-Lys catalytic triad for *Pseudomonas aeruginosa* amidase comes from site-directed mutagenesis and mutations altering substrate specificity. *Biochem. J.*, **365**, 731-738.

O'Driscoll, K.F.; (1976). Techniques of enzyme entrapment in gels, in *Methods in Enzymology*, vol. XLIV (Mosbach, K., ed., Academic, New York, pp. 169-183.

Ough, C.S.; Stevens, D.; Almy, J.; (1989). Preliminary comments on effects of grape vineyard nitrogen fertilization on the future ethyl carbamate formation in wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **40**, 219-220.

Oliveira, I.R.; Vieira, I.C.; (2006). Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. *Química Nova*, vol. **29**, Nº5, 932-939.

Pacheco, R.; Karmali, A.; Matos-Lopes, M.L.; Serralheiro, M.L.; (2005). Amidase encapsulated in TTAB reversed micelles for the study of transamidation reactions. *Biocatalysis and Biotransformation*, **23** (6), 407-414.

Pearl, L.; O'Hara, B.; Drew, R.; Wilson, S.; (1994). Crystal structure of amiC: the controller of transcription antitermination in the amidase operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *The EMBO Journal*, vol.13, n°24, pp.5810-5817.

Peterson, J.I.; Vurek, G.G.; (1984). Fiber optic sensors for biomedical applications. *Science* **224**, 123-127.

Porath, J. and Axén, R.; (1976). Immobilization of enzymes to agar, agarose and Sephadex supports, in *Methods in Enzymology*, vol. XLIV (Mosbach, K., ed.), Academic, New York, pp. 19-45.

Rudge, J. and Bickerstaff, G.F.; (1984). Thermal stability properties of immobilized creatine Kinase. *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 311, 312.

Segel, i.H.; (1976). In *Biochemical Calculation: How to solve Mathematical Problems in General Biochemistry*, 2nd ed, Wiley, New York, 208-272.

Seitz, W.R.; (1987). Optical sensors based on immobilized reagents. In: Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson, G.S. (Eds.), *Biosensors: Fundamentals and applications*. Oxford University Press, London and New York, 559-616.

Singh, M.; Verma, N.; Garg, A.K.; Redhu, N.; (2008). Urea Biosensors – Review. *Sensors and Actuators B: Chem.*, doi:10.1016/j.snb.2008,04,025.

Schlatter, J.; Lutz, W.K; (1990). The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assesment at human dietary exposure levels. *Food Chem. Toxicol.*,**28**, 205-211.

Schepers, A.J.; Meijer, R.G.M.; (1998). Evaluation of the utilization of dietary nitrogen by dairy cows based on urea concentration in milk. *Journal of Dairy Science*, **81**, 579-584.

Shan, D.; Mousty, C.; Cosnier, S.; (2004). Subnanomolar Cyanide Detection at Polyphenol Oxidase/Clay Biosensors. *Anal. Chem.* **76**, 178-183.

Shrivastava, P.K.; Kayastha, A.M.; Shrinivasan; (2001). Characterization of gelatine-immobilized pigeonpea urease and preparation of a new urea biosensor. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **34**, 55-62.

Soldatkin, A.P.; Volotovskiy, V.; El'skaya, A.V.; Jaffrezic-Renault, N.; Martelet, C.; (2000). Improvement of urease based biosensor characteristics using additional layers of charged polymers. *Anal. Chim. Acta*, **403**, 25-29.

Sotiropoulou, S.; Chaniotakis, N.A.; (2005). Lowering the detection limit of the acetylcholinesterase biosensor using a nanoporous carbon matrix. *Analytica Chimica Acta*, **530**, 199-204.

Sotiropoulou, S.; Fournier, D.; Chaniotakis, N.A.; (2005). Genetically engineered acetylcholinesterase-based biosensor for attomolar detection of dichlorvos. *Biosensors and bioelectronics*, **20**, 2347-2352.

Stover, C.K.; Pham, X.Q.; Erwin, A.L.; Mizoguchi, S.D.; Warrenner, P.; Hickey, M.J.; Brinkman, F.S.L.; Hufnagle, W. O.; Kowallk, D.J.; Lagrou, M.; Garber, R.L.; Goltry, L.; Tolentino, E.; Westbrook-Wadman, S.; Yuan, Y.; Brody, L.L.; Coulter, S.N.; Folger, K.R.; Kas, A.; Larblg, K.; Lim, R.; Smith, K.; Spencer, D.; Wong, G.K.S; Wu, Z.; Paulsen, I.T.; Reizer, J.; Saier, M.H.; Hancock, R.E.W; Lory, S.; Olson, M. V.; (2000). Complete Genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, **406**, 959-964.

Stoytcheva, M.; (2002). Electrochemical Evaluation of the Kinetic Parameters of a Heterogeneous Enzyme reaction in Presence of Metal Ions. *Electroanalysis*, **14**, N°13, 923-927.

Srere, P.A. and Uyeda, K.; (1976). Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices, in *Methods in Enzymology*, vol. XLIV (Mosbach, K., ed.), Academic, New York, pp.11-19.

Tata, R.; Marsh, P.; M.; Brown, P.R.; (1994). Arg-188 and Trp-144 are implicated in the binding of urea and acetamide to the active site of the amidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1205**, 139-145.

Taylor, R. F.; (1991). Commercially available supports for protein immobilization, in *Protein Immobilization* (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 139-160.

Thévenot, D.R; Toth, K.; Durst, R.A.; Wilson, G.S.; (1999). Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Pure Appl. Chem.*, Vol.**71**, N°12, pp.2333-2348.

Thomas, G.L.; Bonher, C.M.; Williams, H.E.; Walsh, C.M.; Ladlow, M.; Welch, M.; Bryant, C.E.; Spring, D.R.; (2006). Immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing small molecule probes on mammalian macrophages. *Mol. BioSyst.*, **2**, 132-137.

Verma, Neelam; Singh, Minni; (2003). A disposable microbial based biosensor for quality control in milk. *Biosensors and bioelectronics*, **18**, 1219-1224.

White, C. A. and Kennedy, J. F.; (1980). Popular matrices for enzyme and other immobilizations. *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 82-90.

Woodward, J.; (1985). Immobilized Enzymes: adsorption and covalent coupling, in *Immobilized Cells and Enzymes: A Pratical Approach* (Woodward, J., ed.), IRL, Oxford, 3-17.

Wu, J. C.; Wong, Y. K.; Chang, K. W.; Tay, C. Y.; Chow, Y.; Talukder. M.M.R.; Choi, W. J.; (2007). Immobilization of *Mucor javanicus* lipase by entrapping in alginate-silica

hybrid gel beads with simultaneous cross-linking with glutaraldehyde. *Biocatalysis and Biotransformation*, **25** (6): 459-463.

Zimmerli, B.; Schlatter, J. (1991). Ethyl Carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mut. Res. Gen. Toxicol.*, **259**, 325-350.

Zhang, S.; Zhao, H.; Jonh, R.; (2001). A Theoretical Model for Immobilized Enzyme Inhibition Biosensors. *Electroanalysis*, **13**, 1528-1534.

