

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE PIROGALOL

Resumo

Compostos fenólicos estão presentes abundantemente na natureza, alimentos e fármacos. A qualidade desses pode ser relacionada com a presença de substâncias fenólicas em suas composições. Mesmo em pequenas quantidades, os compostos fenólicos podem afetar o gosto e cheiro de águas potáveis e peixes, e muitos deles podem causar efeitos tóxicos em animais e plantas. Então, o desenvolvimento de um procedimento para detectar e determinar estas espécies é de grande interesse. A utilização de biossensores tem crescido por serem ferramentas promissoras devido a suas características favoráveis. O objetivo do presente trabalho foi a construção e caracterização de um biossensor potenciométrico de pasta de carbono para determinação de pirogalol, associando as vantagens da potenciometria à simplicidade da construção desses biossensores. Os seguintes parâmetros (1) foram determinados: faixa linear, limite de detecção, tempo de vida, histerese, precisão, *drift*, seletividade. Testes de adição e recuperação apresentaram taxa de recuperação entre 90 e 112%.

Palavras-chave: biossensor, potenciometria, pirogalol.

Summary

Phenolic compounds are abundantly present in nature, food, and medicines. Their quality can be related with the presence of phenolic substances in their composition. Even in small concentrations, the phenolic compounds affect the taste and smell of potable waters and fishes, and many of them cause toxic effects in animals and plants. Then, the development of a procedure to detect and to determine these species is of great interest. The utilization of biosensors as promised tools has growth due to their favorable characteristics. The aim of the present work was the construction and characterization of a carbon paste potentiometric biosensor to determine pyrogallol, associating the advantages of potentiometry to the simplicity of construction of these biosensors. The following parameters (1) were found: linear width, detection limit, lifetime, hysteresis, precision, drift, and selectivity. The addition and recovery tests presented recovery rate of 90 to 112%.

Keywords: biosensor, potentiometry, pyrogallol

Introdução

Compostos fenólicos estão abundantemente presentes na natureza como componentes naturais da madeira (lignina e tanino) e são responsáveis pelas propriedades organolépticas e cores de muitas flores e frutas. Assim, a qualidade dos alimentos pode estar relacionada com a presença de substâncias fenólicas em sua composição, principalmente em bebidas alcoólicas e sucos.

Vários fenóis substituídos, como cloro e nitrofenóis, são altamente tóxicos para o homem e organismos aquáticos. Mesmo em pequenas concentrações, os compostos fenólicos afetam o

gosto e o odor de águas potáveis e peixes. Muitos deles possuem efeitos tóxicos em animais e plantas, pois facilmente penetram pela pele e membranas celulares.

Quanto a aplicações de fenóis, tem-se como exemplo as tinturas capilares, que são preparações cosméticas com grau de risco 2 (1, 2). Exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados quanto ao modo e restrição de uso. Fazendo parte destas preparações temos os compostos fenólicos tais como: o-aminofenol, p-aminofenóis e m-amino-

*Eduardo Santos Louzada,
Pedro Orival Luccas e
Cristiana Schmidt de
Magalhães**

Escola de Farmácia e
Odontologia de Alfenas
(EFOA)/ CEUFE,
Departamento de Ciências
Exatas

*Autor para correspondência:
EFOA / CEUFE
Depto. de Ciências Exatas
Caixa Postal 221
CEP 37130-000. Alfenas. MG
Fone: (35) 3299-1260
Fax: (35) 3299-1262
E-mail:
magalhaes@int.foa.br

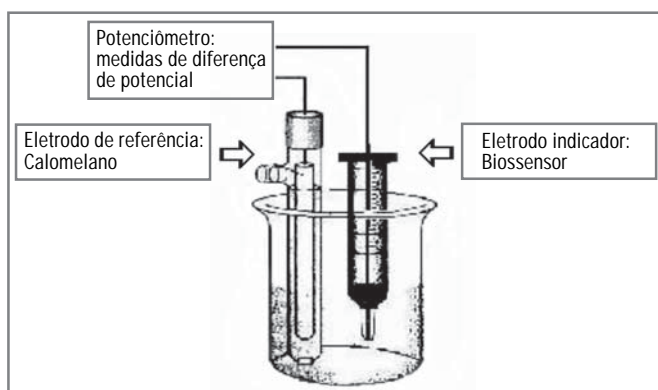


Figura 1: Montagem potenciométrica. O potenciômetro mede a diferença de potencial entre o eletrodo indicador (Biossensor) e o eletrodo de referência (Calomelano).

fenóis, tendo a função de corar os cabelos e fixar os corantes. A concentração de fenóis usados nas tinturas não pode ultrapassar 1%, de acordo com a legislação para tinturas (3), sendo importante sua determinação e quantificação.

Assim, o desenvolvimento de procedimento para a detecção e determinação destas espécies químicas é de grande interesse (4).

Um biossensor enzimático é um instrumento analítico que combina o material biológico, o qual precisa ser imobilizado adequadamente e acoplado em um transdutor. Este monitorará o desaparecimento de algum reagente ou o aparecimento de algum produto da reação do material biológico com o substrato de interesse (5), através de um sinal. Este sinal pode resultar de uma mudança da concentração de prótons, da liberação ou absorção de gases, como amônia ou oxigênio, emissão, absorção ou refletância de luz, emissão de calor, e dessa forma, trazer informações sobre a reação catalisada pela enzima. O transdutor converte este sinal em uma resposta mensurável, tais como corrente elétrica, diferença de potencial elétrico, mudança de temperatura ou absorção da luz através de fenômenos eletroquímicos, térmicos ou ópticos. Este sinal pode ser ainda amplificado, processado ou armazenado para posteriores análises (6).

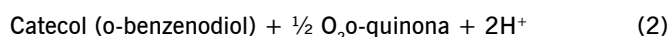
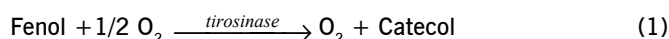
A utilização dos biossensores tem aumentado por serem ferramentas promissoras para complementar as técnicas existentes, devido às suas características únicas, tais como: seletividade, relativo baixo custo de construção e estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis.

A escolha do material biológico do biossensor dependerá do analito a ser estudado, pois o primeiro deverá reagir seletivamente com o analito. Devido às suas propriedades de especificidade, de catalisação (amplificação), alta seletividade e sensibilidade (6,7), as enzimas têm sido largamente usadas como o material biológico dos biossensores.

Existindo um vasto estudo sobre enzimas (8), torna-se acessível e, portanto, mais fácil a escolha delas para comporem o biossensor, sendo que podem ser purificadas em um tecido vegetal ou em extrato bruto.

Devido a grande variedade, disponibilidade e facilidade de

obtenção, o extrato bruto de tecidos vegetais tem sido usado (9,10,11). O extrato bruto foi obtido a partir da abobrinha (*Curcubita pepo*) em que a enzima de interesse é a peroxidase (PER) e do inhame (*Alocasia macrorrhiza*) em que a enzima de interesse é a polifenoloxidase (PFO). As peroxidases constituem uma ampla classe de enzimas, que se encontram extensivamente no reino animal e vegetal. As peroxidases são hemoproteínas (sítio ativo: Fe³⁺ protoporfirínico) com um ciclo catalítico comum. Ruzgas e col. fizeram uma revisão sobre as propriedades catalíticas, estruturais e eletroquímicas de peroxidases (12). A PFO ou tirosinase são enzimas tetraméricas, com uma massa molar na ordem de 120kDa e com dois sítios ativos por molécula. Cada um desses sítios consiste em dois átomos de cobre coordenados com histidinas. As enzimas tirosinases estão amplamente distribuídas na natureza e existem em múltiplas formas. Essas formas podem apresentar diferentes características cinéticas e termodinâmicas. A tirosinase exibe atividade hidroxilase (monofenolase) para monofenóis e atividade oxidase (difenolase) para o-difenóis, que são convertidos a o-quinonas. A tirosinase promove a conversão dos monofenóis em duas etapas consecutivas, que envolvem o oxigênio molecular, conforme mostram as equações 1 e 2. Na primeira etapa, o monofenol é hidroxilado ao seu correspondente o-difenol (a atividade hidroxilase da enzima). Na segunda etapa, o o-difenol é oxidado à sua correspondente o-quinona (a atividade difenolase da enzima), enquanto que a enzima é oxidada de volta à sua forma nativa pelo oxigênio molecular.



O forte poder oxidante do oxigênio torna a reação global irreversível (4). O extrato bruto foi imobilizado por adsorção física. Como foi dito acima, existe uma variedade de transdutores (13).

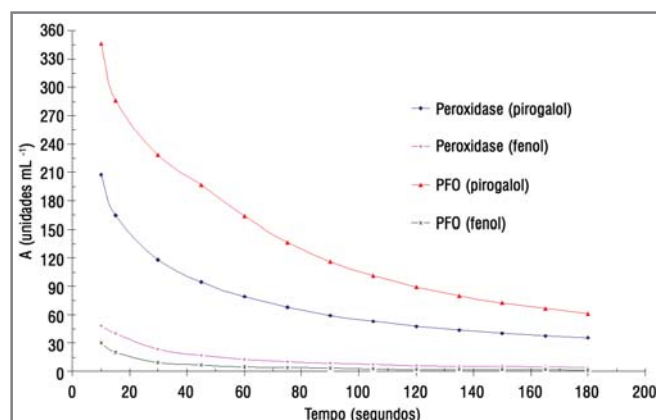


Figura 2. Estudo da média (as medidas foram realizadas em triplicatas) da atividade, A (unidades mL⁻¹) das enzimas PER (extrato bruto de abobrinha) e PFO (extrato bruto de inhame) para o pirogalol (0,05 mol L⁻¹) e para o fenol (0,05 mol L⁻¹) no comprimento de onda 410 nm (formação de o-quinona).

O transdutor utilizado neste trabalho foi o potenciométrico, por ser viável economicamente e corresponder à realidade de recursos disponíveis da nossa Instituição. Recentemente, Thévenot e col. (14) citaram como transdutor potenciométrico apenas os eletrodos de íon seletivo, de vidro, de gás e de metal. Eles não fizeram nenhuma referência sobre os eletrodos de pasta de carbono. Portanto, o presente trabalho propõe associar as vantagens do transdutor potenciométrico, comparado ao amperométrico, à simplicidade da construção dos biossensores de pasta de carbono.

O potencial será gerado pela diferença de potencial entre um eletrodo de referência constante e o eletrodo indicador (biossensor) que varia com a atividade (ou concentração) da espécie que está sendo analisada e medida por um peagâmetro (15).

A aplicação dos biossensores é bastante ampla. A seguir, apresentam-se sucintamente alguns exemplos de suas aplicações. Na área ambiental, tem-se o uso para controle ambiental (16) e para a determinação de pesticidas (17); na área alimentícia, para a determinação de glicose em café instantâneo (18) e de sulfito em alimentos (19, 20); na área farmacêutica, a determinação de ácido ascórbico, dopamina e adrenalina em fármacos. Como últimos exemplos de aplicação, na medicina usam-se os biossensores para a determinação de uréia em urina e em soro humano (21) e como medidores de glicose.

O objetivo do presente trabalho foi a construção e caracterização de um biossensor potenciométrico para a determinação de pirogalol.

Experimental

Instrumental

Foi utilizado um potenciômetro Micronal®, modelo B-271, uma centrífuga Fanem®, modelo Excelsa Baby I, um espectrofotômetro Femto®, modelo 482 e um eletrodo de referência de calomelano, marca Quimis®.

Reagentes

Reagentes de grau analítico foram usados para preparar tampões e soluções padrão. Dihidrogenofosfato de potássio, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio foram obtidos da Vetec®. O pirogalol, fenol e guaiacol, da Labsynth®, e suas soluções foram preparadas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. Este tampão foi escolhido como o melhor para os biossensores de extrato bruto de inhame, de acordo com a literatura (10). Todas as soluções foram preparadas com água destilada.

Procedimento

Obtenção do extrato bruto enzimático

Lavaram-se e secaram-se 25g do vegetal descascado, que

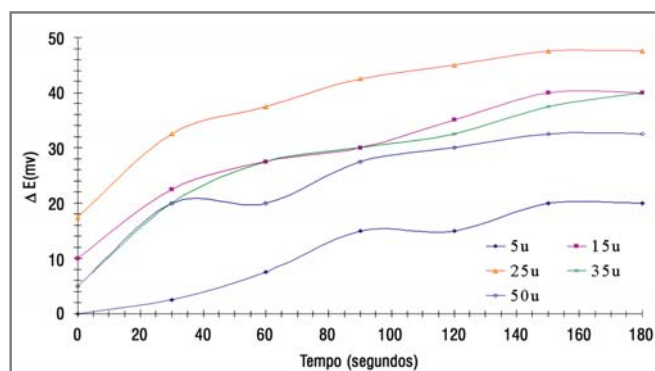


Figura 3. Estudo do tempo de resposta dos biossensores com 5 u, 15 u, 25 u, 35 u, 50 u de PFO em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) para o pirogalol na concentração de 0,05 mol L⁻¹

foi picado e homogeneizado em um liquidificador com 100mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). Logo após, filtrou-se em gaze dobrada em quatro e o extrato foi centrifugado durante 30 minutos, em 5.000r.p.m.. A solução sobrenadante foi armazenada em refrigerador a 4°C, e usada como fonte enzimática de PFO e PER na construção dos biossensores.

Determinação da atividade enzimática

A atividade das enzimas PFO, obtida do inhame e a PER, obtida da abobrinha foram determinadas pelas medidas de absorbância no comprimento de onda de 410nm durante 3 minutos, monitorando a formação de o-quinona. Este tempo foi suficiente para inativar as enzimas na presença de fenol ou pirogalol (22). O produto foi obtido a partir da reação de 0,2mL da solução sobrenadante do inhame e 2,8mL da solução de pirogalol 0,05mol L⁻¹ ou fenol 0,05mol L⁻¹ e da reação de 0,2mL da solução sobrenadante da abobrinha mais 0,1mL de peróxido de hidrogênio 10,3mmol L⁻¹ e 2,7mL de pirogalol 0,05mol L⁻¹ ou fenol 0,05mol L⁻¹, a 25°C.

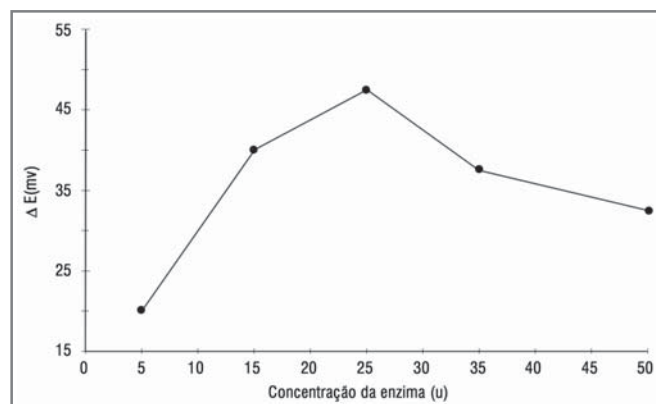


Figura 4. Efeito da concentração da enzima PFO em u (unidades mL⁻¹) sobre a resposta do biossensor, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) para o pirogalol na concentração de 0,05 mol L⁻¹

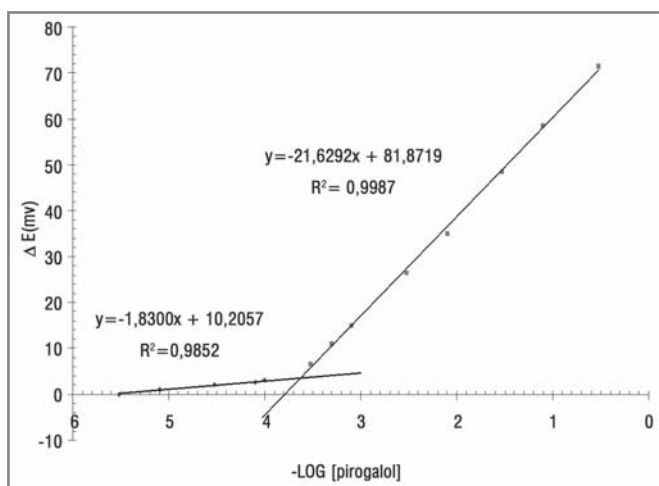


Figura 5. Estudo do limite de detecção e da faixa linear de resposta do biossensor de 25 u de PFO para o substrato de pirogalol nas concentrações entre 8.10^{-6} mol L⁻¹ e 3.10^{-1} mol L⁻¹, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0)

Os brancos utilizados foram compostos de 0,2mL da solução sobrenadante do inhame e 2,8mL do tampão fosfato (pH 7,0) e 0,2mL da solução sobrenadante da abobrinha, mais 0,1mL do peróxido de hidrogênio $10,3$ mmol L⁻¹ e 2,7 mL do tampão fosfato $0,1$ mol L⁻¹ pH 7,0.

Uma unidade de atividade, A (unidades/mL), é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto, nas condições acima mencionadas (23).

Construção do biossensor

Como suporte, utilizou-se grafite pelo baixo custo, baixa capacidade de adsorção de oxigênio e impurezas eletroativas (5). A pasta de carbono foi obtida homogeneizando 0,375g de pó de grafite e X unidades da concentração de enzima (unidades mL⁻¹) em um almofariz com pistilo durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,125g de vaselina (aglutinante) e

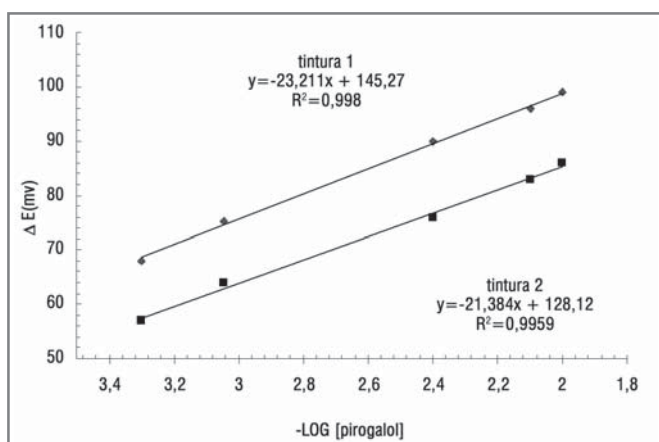


Figura 6. Determinação de fenóis nas tinturas 1 e 2, pelo método de adições de padrão de pirogalol

homogeneizada por mais 20 minutos. Logo após, esta pasta foi embutida em seringas de 1mL e fazendo o contato elétrico com um fio de cobre, estando prontos os biossensores para a realização das leituras. A proporção usada de pó de grafite e vaselina foi de 75:25% m/m por apresentar melhor eficiência (24).

Realização das leituras

As soluções estoque de pirogalol e fenol $0,05$ mol L⁻¹, foram preparadas diariamente, sendo as soluções padrão preparadas por diluições dessas soluções estoque, em balões volumétricos de 100mL e os volumes foram completados com tampão fosfato $0,1$ mol L⁻¹ (pH 7,0). Para realizar as leituras, utilizou-se o eletrodo de calomelano como referência, e o biossensor como indicador, conectados ao potenciômetro.

Resultados e Discussão

Estudo da atividade enzimática

A figura 2, mostra a média (as medidas foram realizadas em triplicatas) da atividade enzimática (unidades mL⁻¹) no comprimento de onda 410nm (formação de o-quinona) em relação ao tempo (segundos), para os extratos brutos de inhame (*Alocasia macrorrhiza*) e abobrinha (*Curcubita pepo*), analisando as enzimas PFO e PER, respectivamente, com as seguintes soluções: pirogalol $0,05$ mol L⁻¹ ou fenol $0,05$ mol L⁻¹. Os resultados mostram que ambas as enzimas tiveram maior afinidade para o pirogalol, em relação ao fenol, sendo a PFO a enzima de escolha, pois se obteve uma maior atividade que a PER.

Estudo do tempo de resposta em função da concentração da enzima

O tempo de resposta foi estudado para cinco biossensores com concentrações de enzima: 5u, 15u, 25u, 35u e 50u, onde u é unidades mL⁻¹. É o que mostra a figura 3, tendo a resposta estabilizada a partir de 150 segundos.

Efeito da concentração da enzima

O efeito da concentração da enzima imobilizada sobre a resposta do biossensor foi estudado, sendo que a resposta do biossensor aumenta com o aumento da concentração da enzima imobilizada até 25u, decrescendo para as concentrações superiores estudadas. A figura 4 mostra esse efeito. Assim, a concentração de 25u foi escolhida para todos os biossensores construídos posteriormente.

Características analíticas do eletrodo e aplicações

Os estudos dos parâmetros analíticos descritos nesta seção foram feitos de acordo com as normas da IUPAC (25, 14).

Observou-se um efeito de memória (histerese) neste eletrodo.

Tabela 1. Resposta relativa do biossensor de extrato bruto de inhame (25 u) para alguns substratos na concentração de $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7.

Substrato	Resposta Relativa (%)
Pirogalol	100
Fenol	3,8
Guaiacol	3,8

Quando realizadas medidas no branco (tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}) e depois em algum substrato, lia-se uma variação no resultado. Entretanto, quando se retornava o eletrodo ao branco, o sinal não voltava imediatamente ao primeiro resultado. Devido a esse efeito de memória, foi determinado o tempo de recuperação do eletrodo monitorando quanto tempo o biossensor necessitaria para retornar ao seu resultado medido no branco. Foi determinado que o sinal do biossensor necessitaria de aproximadamente 7 horas para retornar ao valor inicial. Em virtude deste alto tempo de recuperação, foi escolhido medir as diferenças entre o sinal da solução do substrato e do branco, sempre em triplicatas. Estas medidas foram reprodutíveis com um coeficiente de variação percentual (CV) de 8,91%.

O limite de detecção encontrado foi de $2,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e a faixa linear de $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $3 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ com um coeficiente de correlação linear 0,9987, para os biossensores de 25u de PFO.

A reação de oxidação de polifenóis (pirogalol) é complexa, fornecendo mais de um produto (26). Nas condições adotadas neste trabalho, não existem informações na literatura, sobre o número de elétrons envolvidos na reação enzimática. Portanto, não se fez inferências sobre a resposta Nernstiniana. A despeito disso, os resultados apontam uma boa sensibilidade do sistema: 21,6292mV/(mol L^{-1}), tornando assim, viável a aplicação do método proposto. Os resultados das medidas estão apresentados na figura 5.

Realizou-se o estudo do tempo de resposta do biossensor para a concentração fixa de 25u de PFO variando-se as concentrações do substrato pirogalol em um intervalo de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0). Comprovou-se que o tempo de resposta para estabilização do sinal é de 150 segundos, mesmo para várias concentrações de pirogalol.

O biossensor permaneceu estável durante 30 a 33 dias, aproximadamente. Durante este intervalo de dias efetuaram-se medidas sob idênticas condições, tais como: concentração de pirogalol (0,08 mol L^{-1}), pH 7,0, tempo de medição, temperatura, etc. A partir dos resultados destas medidas, observou-se que a resposta do biossensor variou de forma não aleatória entre 25 e 40mV. Dessa maneira, pôde-se também estudar o parâmetro "drift". Obteve-se o coeficiente angular de $-0,0102 \text{ mV dia}^{-1}$, o que indica uma inclinação pequena da reta e, portanto, um "drift" desprezível.

A Tabela 1 mostra a resposta relativa do biossensor para os substratos de pirogalol, guaiacol e fenol, com substratos na

concentração de $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7,0. O biossensor de 25u mostrou-se mais seletivo para o pirogalol, seguido pelo fenol e guaiacol, que apresentaram mesma sensibilidade.

Aplicação

Realizou-se a análise de pirogalol em tinturas de cabelo, pelo método de adições de padrão. As amostras de tintura analisadas foram tinturas comerciais de duas marcas conhecidas no mercado e duas colorações diferentes. A tintura 1 era líquida e foi diluída em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) na proporção de 1:100, sendo adicionados padrões de pirogalol (figura 6), com adições de concentração no intervalo entre 5×10^{-4} e $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

A tintura 2 era uma tintura em pó e foi diluída em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0), também na proporção de 1:100, sendo adicionados os mesmos padrões de pirogalol nesta amostra (figura 6). Felizmente, os resultados obtidos para ambas as amostras mostraram a ausência de pirogalol e que a concentração de compostos fenólicos está abaixo do permitido. Apesar destes resultados, os testes de adição e recuperação apresentaram uma taxa de recuperação de 90 a 112%, para adições de concentração no intervalo de 5×10^{-4} a $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Este fato vem, portanto, comprovar a eficiência dos biossensores para este tipo de amostras.

Conclusão

O extrato bruto de inhame apresentou uma melhor atividade enzimática que o de abobrinha, sendo que a PFO presente no inhame teve maior afinidade com o pirogalol do que com o fenol. Assim, foram construídos biossensores de pasta de carbono com o extrato bruto de inhame, sendo que os melhores resultados foram obtidos com um biossensor de 25 unidades de PFO com um tempo de resposta de 150 segundos.

Foi realizada a caracterização analítica do eletrodo, nos seguintes parâmetros: faixa linear ($3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $3 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) com um coeficiente de correlação de 0,9987, limite de detecção ($2,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), tempo de vida (30 a 33 dias), histerese com um tempo de recuperação de 7 horas, precisão (CV = 8,91%), "drift" (coeficiente angular = $-0,0102 \text{ mV dia}^{-1}$), seletividade (100% pirogalol e 3,8% fenol e guaiacol). Os testes de adição e recuperação apresentaram taxa de recuperação de 90 a 112%, com adições de concentração na faixa de 5×10^{-4} a $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

A aplicação do biossensor apresentou resultados satisfatórios, quando este foi testado para a determinação da concentração de fenóis em amostras de tintura de cabelos, usando o método de adição de padrões.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao PROBIC (CNPq) / EFOA e a FINEP SINDCT/CT INFRA 0990/01, pelo apoio financeiro.

Referências

1. Portaria No. 71 de 29 de Maio de 1996, ANEXO XI, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, www.anvisa.gov.br/legis/portarias/71_96.htm
2. Resolução No. 79 de 28 de Agosto de 2000, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, publicado no DOU de 31 de Agosto de 2000, [www.anvisa.gov.br/base/visadoc/res/res\[473-1-0\].htm](http://www.anvisa.gov.br/base/visadoc/res/res[473-1-0].htm)
3. Portaria No. 90 de 11 de Janeiro de 2002, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, publicado no DOU de 14/01/2002, www.anvisa.gov.br/legis/portarias/90_02.htm
4. Rosatto SS, Freire RS, Duran N, Kubota LT. **Química Nova** 2001, 24, 77-86.
5. Fatibello-Filho O, Capelato MD. **Química Nova** 1991, 15, p. 28-39.
6. Mulchandani A, Rogers KR. *Enzyme and Microbial Biosensors. Techniques and Protocols*; Humana Press; Totowa; New Jersey, 1998.
7. Palmer T. **Understanding Enzymes**; John Willey & Sons; New York, 1985.
8. Dixon M, Webb EC. **Enzymes**; Academic Press; New York, 1979.
9. Uchiyama S. et al. **Anal. Chim. Acta** 1998, 208, 291.
10. Signori CA, Fatibello-Filho O. **Química Nova** 1994, 17(1), 38.
11. Caruso CS, Vieira IC, Fatibello-Filho O. **Anal. Lett.** 1999, 32 (1), 39-50.
12. Ruzgas T, Csöregi E, Emnéus J, Gorton L, Marko-Varga, G. **Anal. Chim. Acta** 1996, 330, 123.
13. Janata, J. et al. **Anal. Chem.** 1994, 66, 207.
14. Thévenot DR, Thot K, Durst RA, Wilson GS. **Biosensors & Bioelectronics** 2001, 16, 121-131.
15. Skoog DA, West DM, Holler FJ. **Fundamentals of Analytical Chemistry**; Saunder College Publishing; Orlando, Flórida, EUA, 1996.
16. Karube I. **Trends in Anal. Chem.** 1995, 14(7), 295.
17. Trojanowicz M, Hitchman ML. **Trends in Anal. Chem.** 1996, 15(1), 38.
18. Oliveira-Neto G. et al. **Anal. Chim. Acta** 1993, 280, 49.
19. Fonong T. **Anal. Chim. Acta** 1986, 184, 287.
20. Beutler HO. **Food Chem.** 1984, 15, 157.
21. Eggins BR. **Biosensor: An Introduction**; Wiley Teubner; New York, 1996.
22. Summer JB, Myrbäck K. **The Enzymes-Chemistry and Mechanism Action**; Academic Press Inc. Publishers; New York, Vol. III, part I, cap. 57, 1951.
23. Shannon CT, Pratt DE. **J. Food Sci.** 1977, 32, 479.
24. Vieira JC. **Biosensores**; apostila do curso apresentado na V Escola de Inverno em Físico – Química e Química Analítica, UFSCAR, julho, 2000.
25. Buck RP, Lindner E. **Pure & Appl. Chem.** 1994, 66, 12, 2527-2536.
26. Allinger NL, Cava MP, Jongh DC, Johnson CR, Lebel NA, Stevens CL. **Química Orgânica**, Guanabara Dois, 2ª. ed., 1978.

Nova Ética, qualidade que você precisa.

Freezer -20° C
modelo 415D

Durômetro de Comprimidos com
Medidor de Espessura e Diâmetro
modelo 298-ED



Estufa para
Esterilização
modelo 400D



Nova Ética
Rua Francisca Manoel Oliveira, 500
06730-000 - Vargem Grande Paulista - SP

Tel.: (11) 4158-2525
e-mail: novaetica@novaetica.com.br
www.novaetica.com.br



Nova Ética
Qualidade e Precisão no seu Laboratório