

Antonio William Oliveira Lima e Lúcio Angnes*

Departamento de Tecnologia Química e Alimentos - Universidade Federal da Paraíba - 58000 020 - João Pessoa - PB

Departamento de Química Fundamental - Instituto de Química - Universidade de São Paulo - 05508 900 - São Paulo - SP

Recebido em 8/10/97; aceito em 16/4/98

BIOCATALYSIS IN AQUO-RESTRICTED MEDIA: FUNDAMENTS AND APPLICATIONS IN ANALYTICAL CHEMISTRY. The ability of enzymes to function in aquo-restricted media (commonly reported as non-aqueous media) has greatly enlarged the applications in numerous fields. The development of biosensors was also benefited with this area, expanding their applications toward many previously inaccessible analytes, enlarging significantly the scope of applications. In this review, some basic factors that influence biocatalytical reactions in aquo-restricted media is discussed. Attention is focused on the development, advantages and analytical applications of biosensors in non-aqueous media. Recent examples and relevant applications of their use are presented.

Keywords: enzymes in aquo-restricted media; biosensors; organic solvents.

INTRODUÇÃO

Na última década, os conceitos relativos as reações enzimáticas mudaram drasticamente. Embora a constatação que certas enzimas apresentam atividade catalítica em meio orgânico date do início do século, foi a partir dos anos 80 que as macromoléculas biológicas passaram a ser vastamente utilizadas em outros meios que não o aquoso. Dentre as numerosas aplicações de reações enzimáticas em meio orgânico, destacam-se a síntese de produtos de interesse nas áreas clínica, nutricional, ambiental, industrial e biotecnológica. Paralelamente, a utilização de biosensores em meio não aquoso também levou a novas aplicações, tornando possível trabalhar em meios até então inexplorados ou analisar espécies de caráter hidrofóbico, entre outras vantagens. A seguir serão apresentados vários aspectos de importância no controle da atividade enzimática em solventes orgânicos, bem como diversas aplicações analíticas envolvendo reações enzimáticas em meio não aquoso.

REAÇÕES ENZIMÁTICAS EM MEIO AQUOSO

A utilização de reações enzimáticas pelo homem se confunde com os primórdios da civilização. Inicialmente esta utilização ocorreu exclusivamente de forma doméstica, para mais recentemente tornar-se de grande importância em uma vasta gama de aplicações industriais.

Nas últimas décadas, a extraordinária seletividade de substratos (incluindo quimio-, régio- e enantio-especificidade), passou a ser explorada de forma cada vez mais intensa. A capacidade das enzimas de catalisar reações em meio aquoso, em condições moderadas de temperatura e de pressão, reduzem a possibilidade de danos a analitos termossensíveis e minimizam, também, os efeitos de corrosão em alguns processos químicos. Em contrapartida, a aplicação eficaz de enzimas tem sido restrita devido a uma série de limitações, particularmente aquelas referentes à sua estabilidade operacional (essencial para uso por longos períodos ou para procedimentos automatizados) e, em muitos casos, à pouca solubilidade dos analitos.

Para eliminar esses efeitos desfavoráveis, algumas estratégias têm sido investigadas. A mais antiga é a via sintética¹ que

utiliza técnicas da química orgânica buscando a síntese de catalisadores com atividades similares à de enzimas. Recentemente, foi demonstrado que técnicas de engenharia de proteínas podem promover a formação de ligações intramoleculares estrategicamente posicionadas, a modificação da polaridade ou, ainda, a alteração da densidade de carga na superfície da proteína^{2,3}, produzindo biocatalisadores robustos capazes de manterem a atividade catalítica mesmo em condições pouco favoráveis. Outra abordagem tem sido a utilização de procedimentos para a imobilização (insolubilização) das enzimas, preferencialmente, através de ligações covalentes (opção de um ou vários pontos de ligação) Neste caso, ligações múltiplas originam preparações mais estáveis, entretanto com menor flexibilidade espacial das enzimas, resultando geralmente em decréscimo de atividade.

Esses métodos de imobilização estão disseminados tanto em aplicações industriais como em sistemas de análise. Exemplos de aplicações analíticas envolvendo enzimas imobilizadas são os biosensores, os reatores para análises cromatográficas ou em sistemas de análise por injeção em fluxo, cabendo ainda destacar aplicações envolvendo kits para titulações e para imunoensaios. Contudo, os procedimentos de imobilização, normalmente, são laboriosos e bastante demorados além de acarretarem limitações difusionais e ainda custos adicionais. As principais vantagens advindas da aplicação de enzimas imobilizadas^{4,5} são mostradas na Tabela 1.

Uma outra possibilidade, para reduzir as limitações da estabilidade, é o emprego direto de enzimas naturais de organismos extremófilos que são bastante estáveis às "intempéries" ambientais^{6,7} em seu meio natural.

Com respeito às restrições de solubilidade do analito, os recursos mais utilizados são a adição de um solvente miscível ou de um surfactante no meio onde ocorrerá a reação. Frequentemente, o emprego desses aditivos pode provocar diminuição da atividade enzimática.

Os métodos enzimáticos convencionais têm sido empregados em meio aquoso principalmente devido a idéia preconcebida de que este é um bom ambiente para a manutenção da conformação estrutural da enzima cataliticamente ativa. Essa noção não é completamente verdadeira. Muitas enzimas (ou complexos multienzimáticos) tais como *lipases*, *esterases*, *desidrogenases* e aquelas responsáveis pelo metabolismo xenobiótico, são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos naturais⁸

e-mail: luangnes@iq.usp.br

Tabela 1. Vantagens da utilização de enzimas imobilizadas.

- As enzimas podem ser reutilizadas
- Os processos químicos podem ser continuamente operados e prontamente controlados
- Os produtos podem ser facilmente separados
- Os problemas de efluentes e manipulação de materiais são minimizados
- Em alguns casos, as propriedades enzimáticas (atividade e estabilidade operacionais) podem ser alteradas
- As enzimas podem ser facilmente combinadas com vários transdutores
- A reprodutibilidade do procedimento analítico pode ser aumentada
- Facilidade de construção de transdutores enzimáticos

com eficiência similar àquela em soluções aquosas, ou em certos casos, até superior. Em sentido estrito, podem ser considerados como ambientes não-aquosos os solventes orgânicos⁹⁻¹², os fluidos supercríticos¹³, os gases¹⁴, os substratos líquidos ou misturas eutéticas de substratos livres de solvente¹⁵.

Reações enzimáticas em meios aquo-restritos

A catálise enzimática em meio orgânico possui uma enorme potencialidade para aplicações em síntese orgânica (separação de álcoois ou ácidos racêmicos^{16,17}, síntese de peptídeos¹⁸), na indústria (síntese de aspartame¹⁹, interesterificação regioselectiva de óleos e gorduras²⁰) e particularmente, na (bio)analítica²¹.

Apesar do reconhecimento desses benefícios, o número de trabalhos onde enzimas têm sido utilizadas para propósitos analíticos em meio não-aquoso é, ainda, bastante limitado, quando comparado com a profusão de monografias produzida em fase aquosa. As principais razões listadas por Braco²² que

podem justificar esse desequilíbrio no uso de meios aquosos e não-aquosos em métodos analíticos mediados por enzimas são:

- a) o comportamento de inúmeras enzimas em ambientes aquo-restritos ainda permanece inexplorado;
- b) muitas amostras reais são aquosas ou encontram-se em meio aquoso o que implica, muitas vezes, ou numa partição ineficiente ou no acréscimo de uma etapa no processo para a extração do analito de interesse na fase orgânica;
- c) os fundamentos da enzimologia em meios não-aquosos foram estabelecidos muito recentemente;
- d) o uso de solventes orgânicos pode, muitas vezes, colocar em risco a saúde do analista (por serem tóxicos, inflamáveis e/ou explosivos) além de poderem acarretar problemas ambientais. A esse respeito, a possibilidade do emprego de solventes não-tóxicos, biocompatíveis com os lipídeos em aplicações analíticas tem sido amplamente explorada²³.

Inúmeras pesquisas têm demonstrado as vantagens da biocatálise em meios aquo-restritos, oferecendo uma oportunidade ímpar para o desenvolvimento de novas tecnologias e de biosensores na determinação de importantes analitos (insolúveis em água) e de matrizes de amostras hidrofóbicas. Na Tabela 2 são apresentadas as principais vantagens da realização de reações enzimáticas em meios aquo-restritos.

A introdução de biosensores eletroquímicos, em meios não-aquosos, tem encontrado variadas aplicações no processamento industrial e em testes de controle de qualidade. Quando utilizados em sistemas de análise por injeção em fluxo, propriedades tais como velocidade, portabilidade e simplicidade de análise são conseguidas. Neste contexto, o desenvolvimento de novos biosensores amperométricos em meios não-aquosos deve ser explorado em profundidade por químicos, bioquímicos e engenheiros.

A seguir, serão discutidos de forma concisa, os princípios básicos do comportamento das macromoléculas biológicas (enzimas, anticorpos, anticorpos catalíticos) e receptores abióticos em ambientes não-aquosos (função da água, critérios para a seleção do solvente, efeitos de memória, estabilidade térmica,

Tabela 2. Vantagens da realização da biocatálise em meios aquo-restritos.

SOLVENTES ORGÂNICOS

- Catálise eficiente pode ser alcançada com substratos (não polares) pouco solúveis em água; estas modificações induzidas pelo solvente na eficiência enzimática ou especificidade de substrato pode, potencialmente, aumentar o limite de detecção por modificações aparentes na constante de Michaelis-Menten
- Reações indesejáveis bem como inibição do substrato ou do produto podem ser reduzidas
- A estabilidade térmica das enzimas é aumentada acarretando a ampliação do intervalo operacional da temperatura e a sua vida útil
- A imobilização é freqüentemente desnecessária porque enzimas são insolúveis nestes meios
- Se a imobilização é desejada, a adsorção da enzima em superfícies não porosas é satisfatória
- A contaminação microbiana é eliminada
- A recuperação e a reutilização da enzima ficam mais fáceis

FASE GASOSA

- Imobilização não é necessária ou muito simplificada visto que o biocatalisador encontra-se em fase sólida. Reatores em batelada ou contínuos podem ser usados e a recuperação do biocatalisador é bastante facilitada
- A adição de solventes é evitada e a produção de produtos secundários é, assim, muito limitada facilitando a separação e a purificação durante o processamento podendo, portanto, melhorar a produtividade
- A transferência de massa na fase gasosa é freqüentemente mais eficiente do que em solução. Assim, as reações são menos afetadas por problemas difusionais
- Produtos voláteis, tóxicos ou inibidores podem ser removidos continuamente

FLUIDOS SUPERCRTICOS (FSC)

- Reações de síntese nas quais a água é um produto indesejável podem ser evitadas
- As solubilidades dos materiais hidrofóbicos são relativamente incrementadas
- A termoestabilidade das biomoléculas em FSC é superior do que em água
- O solvente pode ser prontamente reciclado
- Reações bioquímicas e separações podem ser integradas em uma única etapa

alteração da especificidade enzimática, influência do pH). Aplicações correntes e perspectivas futuras de biossensores em fase orgânica também serão abordados.

Fatores que controlam a atividade enzimática em solventes orgânicos

Água

As propriedades solventes da água resultam das forças atrativas fortes (as pontes de hidrogênio) que existem entre as suas moléculas. A molécula de água e seus produtos de ionização, H^+ e OH^- , influenciam profundamente a estrutura, a automontagem e as propriedades das enzimas. As biomoléculas polares dissolvem-se facilmente na água (*hidrofilicas*) porque elas podem substituir as interações moleculares água-água, energeticamente favoráveis, por interações do tipo pontes de hidrogênio e eletrostáticas, ainda mais favoráveis, no sistema água-soluto. A variação da entalpia (ΔH) pela dissolução desses solutos é, geralmente, pequena. Diferentemente, moléculas não-polares interferem com as interações água-água e são muito pouco solúveis na mesma água (*hidrofóbicas*). Estas moléculas não-polares tendem, quando em solução aquosa, a agregarem-se de forma a minimizar os efeitos energeticamente desfavoráveis provocados pela sua presença.

Biomoléculas como as enzimas são *anfipáticas*, possuindo regiões superficiais polares (ou carregadas) e não-polares. Em um ambiente aquoso, essas duas regiões da molécula experimentam tendências conflitantes; a região hidrofílica interage favoravelmente com a água enquanto a região hidrofóbica tem a tendência de evitar o contato com a água (Figura 1A). Assim, os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos das enzimas agregam-se para apresentar a menor área hidrofóbica possível à água (ficam confinados no interior da molécula protéica) e as regiões polares são arranjadas para maximizar as interações com o solvente aquoso (Figuras 1B e 1C).

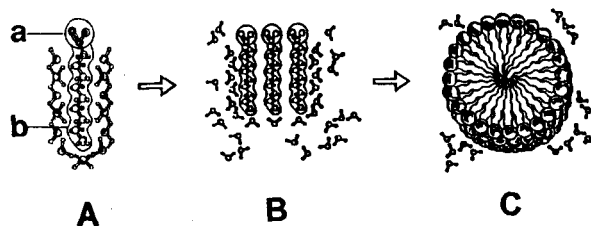


Figura 1. Etapas de formação de micelas: (A) Representação da extremidade hidrofílica (a) e da região hidrofóbica (b), envolta por camada de moléculas de água altamente ordenadas de uma biomolécula; (B) Ordenação das moléculas com conseqüente diminuição do número de moléculas de água; (C) Formação da micela com eliminação de água.

Quando a água é substituída por um solvente orgânico, alterações na conformação nativa da enzima podem ocorrer tanto na estrutura terciária como nas mais proeminentes estruturas secundárias (a α -hélice e a conformação β) acarretando, desta maneira, a sua desestabilização. Com o objetivo de assegurar uma conformação enzimática cataliticamente ativa em meio orgânico, a molécula da enzima deve ter uma camada de hidratação definida^{24,25}, separando o solvente do contato com a superfície da proteína e contribuindo para o aumento da sua flexibilidade interna.

Quando água é adicionada a um sistema enzimático não-aquoso, ela é distribuída entre solvente, enzima, substrato e suporte (se presente). A quantidade de água ligada as moléculas de enzima é fundamental para a atividade catalítica em meio não aquoso. A explicação mais provável para isso advém do fato da água aumentar a mobilidade e a flexibilidade dos sítios ativos e, concomitantemente, a polarização da estrutura protéica.

Numerosas discussões e trabalhos²⁶⁻²⁸ têm sido dedicados para determinar a quantidade adequada de água para a atividade enzimática em meio orgânico. Zaks e Klibanov²⁷ examinaram três modelos de enzimas - *polifenoloxidase*, *álcool desidrogenase* e *álcool oxidase* - em solventes de hidrofobicidades e conteúdos de água diferentes. Eles mostraram que a atividade enzimática estava relacionada à quantidade de água ligada à proteína e não à concentração de água nos solventes orgânicos. A água ligada àquelas enzimas em solventes orgânicos não formaria uma camada de água verdadeira mas, de preferência, uns poucos "clusters", provavelmente, em torno de regiões carregadas e polares da superfície enzimática. Os resultados desse estudo foram re-interpretados em termos de atividade de água por Halling²⁹, confirmando que a atividade enzimática ótima está relacionada com a atividade de água, independente do solvente usado. Este mesmo autor³⁰ tem proposto que a atividade termodinâmica da água é um parâmetro que deve ser usado para quantificar o nível de água associado com a enzima. A água, dessa maneira, é requerida, unicamente, para a função catalítica das enzimas em solventes orgânicos, contribuindo para a formação de todas as ligações não covalentes e pontes de hidrogênio da estrutura protéica.

A quantidade de água necessária para catálise depende das características de cada enzima. *Lipases* são altamente ativas quando poucas moléculas de água estão associadas com a molécula protéica³¹⁻³³. *Subtilisina* e *α -quimotripsina* necessitam menos de 50 moléculas de água por molécula de enzima para exibir sua atividade mínima²⁷. *Álcool oxidase*, *álcool desidrogenase* e *polifenoloxidase*, entretanto, são unicamente ativas quando um elevado número de moléculas de água ($3,5 \times 10^7$) estão ligadas com a molécula de enzima formando uma monocamada³⁴.

Água fortemente ligada pode ser encontrada em preparações enzimáticas desidratadas por liofilização em níveis tão baixo quanto 0,01%. Wehtje et al.³⁵ utilizaram a *α -quimotripsina* em acetato de etila com diferentes concentrações de água e verificaram grandes modificações na atividade catalítica desta enzima. Há um aumento da velocidade de reação com o incremento do grau de hidratação da enzima até atingir uma condição ótima (Figura 2). Isso, provavelmente, se deve ao aumento da flexibilidade interna da molécula de enzima. Um aumento acima destes valores resultou na diminuição da atividade enzimática. Nesse caso, a água atuaria como um substrato na reação enzimática especialmente em reações hidrolíticas, produzindo reações secundárias e diminuindo o rendimento do processo químico. Outros autores^{36,37} têm comprovado que a água está envolvida em muitos processos de inativação enzimática propiciada pela agregação da enzima devido as reações de transmutação e formação intermolecular de pontes de dissulfeto.

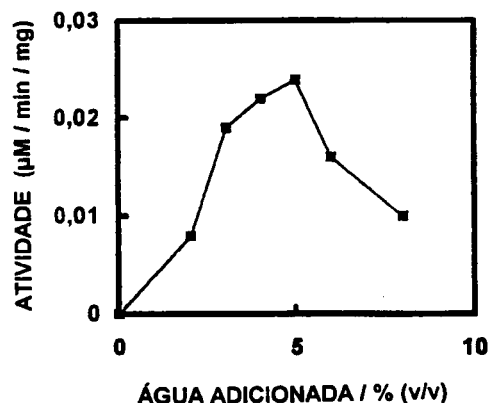


Figura 2. Atividade catalítica da α -quimotripsina em acetato de etila em diferentes concentrações de água. A enzima foi depositada sobre Chromosorb W/AW e catalisou a esterificação do N-acetil-L-fenilalanina com etanol³⁵.

Existe um consenso de que as enzimas são mais termoestáveis em meios com baixo conteúdo de água do que em soluções aquosas. Isto pode ser explicado pelo aumento da rigidez e pelos processos covalentes envolvidos na inativação irreversível, tais como deamidação, hidrólise de peptídeos e decomposição da cistina, que necessitam de água. Estes processos são extremamente lentos em meios de baixa concentração de água. O aumento da termoestabilidade tem sido mostrado para *lipase* do pâncreas de suínos¹⁰, *α-quimotripsina*²⁷, *ribonuclease*, *α-quimotripsina*, *lisozima*³⁶ e *tirosinase*³⁸.

Embora a presença de água ligada seja uma condição necessária para a retenção da atividade catalítica e estabilidade em meios não-aquosos, alguns estudos têm demonstrado que as enzimas *eritrocupreína*³⁹, *xantina oxidase*⁴⁰, *lipase pancreática*⁴¹ e *subtilisina*⁴² retêm sua atividade catalítica em solventes orgânicos verdadeiramente anidros (dimetilsulfóxido, formamida, piridina ou dimetilformamida). Os mecanismos moleculares que protegem a conformação dessas enzimas e as suas propriedades catalíticas nesses solventes orgânicos ainda permanecem obscuros.

Além dessas propriedades naturais, a modificação química pode reduzir a quantidade de água requerida por uma enzima tornando-a, desta maneira, mais hidrofóbica. Esta sugestão foi comprovada pelo aumento na atividade da *peroxidase* após deglicosilação ou modificação benzil- e poli-(etileno glicol)⁴³.

Solvente

As modificações no sistema biocatalítico somente afetarão o biocatalisador quando estas ocorrerem nas proximidades moleculares da enzima. Quando se dissolve um solvente orgânico imiscível em água (sistema bifásico líquido-líquido) a concentração do solvente é variável e depende de sua solubilidade em água. Isto significa que o biocatalisador, nesses sistemas, não experimenta uma concentração do solvente que exceda a solubilidade deste na fase aquosa. Dessa maneira, o biocatalisador estará exposto na interface do sistema líquido-líquido o qual poderá ser nocivo para ele⁴⁴.

Para solventes miscíveis não há limite de solubilidade do solvente na fase aquosa e qualquer concentração deste pode ser obtida nestes sistemas. Tem sido mostrado que há um valor limite para a concentração do solvente orgânico onde se inicia a inativação (ver Tabela 3)^{45,46}. Tem sido demonstrado quantitativamente, que solventes não polares não são suficientemente solúveis em água para alcançar a concentração limite de inativação⁴⁷.

Os efeitos do solvente sobre a velocidade de reação da catálise enzimática em sistemas de uma ou duas fases podem ser diretos ou indiretos⁴⁸. Os efeitos *indiretos* compreendem a partição de reagentes e de produtos, a alteração do equilíbrio químico e mais a transferência de massa em sistemas de duas fases. Os efeitos diretos são responsáveis pela redução da atividade e pela inativação (desestabilização) da enzima através de dois mecanismos: primeiramente, pela interação solvente-enzima que altera a conformação nativa da enzima devido a penetração do solvente no âmago hidrofóbico da proteína provocando a quebra das ligações de hidrogênio e das interações hidrofóbicas⁴⁹.

Uma exceção, seria a estabilização conformacional adquirida pela enzima em meios não-aquosos, através do "efeito gaiola". Neste caso, as moléculas das enzimas, no interior da proteína, estariam firmemente espremidas pelas moléculas ao seu redor⁵⁰ à semelhança das enzimas imobilizadas.

Outra maneira na qual os solventes afetam a atividade é por interação direta com a água essencial em torno da molécula enzimática⁵¹. Solventes altamente polares são capazes de absorver água avidamente e retirar a camada de hidratação da enzima, provocando a perda das propriedades catalíticas por inativação ou desnaturação. Reciprocamente, os solventes hidrofóbicos por serem menos capazes de arrastar "para fora"

Tabela 3. Dependência da atividade catalítica relativa das enzimas dissolvidas com a concentração de solventes orgânicos em misturas binárias.

Enzima	Solvente (vol %)	Atividade relativa (%) ^a
<i>Acetona</i>		
<i>Lacase</i>	0	100
	15	100
	20	50
	30	<10
<i>Acetonitrila</i>		
<i>Tripsina</i>	0	100
	40	100
	50	50
	60	<10
<i>Etanol</i>		
<i>α-quimotripsina</i>	0	100
	30	100
	36	50
	>45	>10

a- expressa em termos de velocidade máxima. Fontes: Mozhaev et al. (45); Kmhmelnitsky et al. (46).

ou deformar a camada de hidratação podem apenas afetar parcialmente a atividade catalítica.

É importante frisar que há exceções notáveis. A *xantina oxidase*⁴⁰, a *lipase* pancreática suína⁴¹ e a *subtilisina*⁴² mantêm suas propriedades catalíticas tanto em solventes orgânicos como em meio aquoso. Uma possível explicação para este fato é que essas enzimas são capazes de reter sua camada de hidratação tão fortemente que mesmo solventes hidrofílicos não conseguem retirar a água.

Muitas maneiras diferentes têm sido descritas na literatura para quantificar a hidrofobicidade⁵². Os mais importantes indicadores de hidrofobicidade são citados na Tabela 4.

Tabela 4. Indicadores de hidrofobicidade.

δ : parâmetro de solubilidade de Hildebrand
ET : solvatocromismo de corante
ε : constante dielétrica
μ : momento dipolar
Log P : logaritmo do coeficiente de partição

Laane et al.⁵³ discutiram amplamente os parâmetros da Tabela 4 e concluíram que o Log P apresentava a melhor correlação com a atividade enzimática. Desta maneira, o Log P, definido como o logaritmo do coeficiente de partição em um sistema bifásico padrão octanol/água foi introduzido como uma medida quantitativa da polaridade do solvente.

Para moléculas simples, os valores do Log P são conhecidos ou podem ser calculados das constantes fragmentais hidrofóbicas (*hydrophobic fragmental constants - hfc*) de Rekker e Kort⁵⁴. Estes valores foram obtidos por comparação dos valores de Log P de uma série de compostos homólogos determinados experimentalmente. Os compostos orgânicos mais comuns e seus respectivos Log P estão listados na Tabela 5. Pela adição do *hfc* próprio, o Log P pode ser calculado para qualquer composto relativamente simples.

Para exemplificar, o Log P do pentanol (CH₃ (CH₂)₄OH) é: 1 x CH₃ + 4 x CH₂ + 1 x OH = 1 x 0,701 + 4 x 0,519 + (-1,595) = 1,182, que é um valor próximo ao determinado experimentalmente, 1,30. Deve-se notar que para estruturas conjugadas os cálculos são mais elaborados, pois correções são necessárias para produzir o valor Log P adequado. Geralmente,

Tabela 5. Valores do Log P para alguns solventes orgânicos.

Solvente	Log P	Solvente	Log P
Dimetil sulfóxido	-1,30	Ácido benzóico	1,90
Dioxano	-1,10	Éter dipropílico	1,90
Metanol	-0,76	Clorofórmio	2,00
Acetonitrila	-0,33	Benzeno	2,00
Etanol	-0,24	Heptanol	2,40
Acetona	-0,23	Tolueno	2,50
Acetato de metila	0,16	Estireno	3,00
Propanol	0,28	Xileno	3,10
Tetrahidrofurano	0,49	Hexano	3,50
Butanol	0,80	Decanol	4,00
Éter dietílico	0,85	Heptano	4,00
Ciclohexanona	0,96	Octano	4,50
Hexanona	1,30	Dodecanol	5,00
Pentanol	1,30	Ftalato de dibutíl	5,00
Fenol	1,50	Undecano	6,10
Ciclohexanol	1,50	Tetradecano	7,60
Trietilamina	1,60	Hexadecano	8,80
Hexanol	1,80	Oleato de butila	9,80

Fonte: Laane et al.⁵³.

para estruturas mais complexas, o Log P é determinado pela medida da concentração no equilíbrio do soluto em ambas as fases, por técnicas convencionais.

Há poucos casos de desvios mais acentuados entre os valores calculados e os preditos: pentanol, 1,56⁵⁵ comparado com 1,3; ciclohexanol, 1,23⁵⁶ comparado com 1,5; acetato de benzila, 1,96⁵⁶ comparado com 1,6; CCl₄, 2,72⁵⁶ comparado com 3,0 e pentano, 3,31⁵⁶ comparado com 3,0. Algumas dessas diferenças podem refletir erros nas medidas. Em compensação, boa concordância têm sido conseguida para numerosos solventes.

Baseado nestes resultados, o Log P foi introduzido como uma medida quantitativa da polaridade do solvente^{53,57}. Geralmente, a atividade enzimática é baixa em solventes relativamente hidrofílicos, que apresentam Log P < 2, é moderada em solventes tendo Log P entre 2 e 4 e é alta em solventes apolares, onde Log P > 4 (ver Tabela 5).

Outro fator a ser considerado para a seleção do solvente é a solubilidade do substrato e do produto nos meios⁵⁸. Por ex., açúcares são solúveis apenas em solventes hidrofílicos (miscíveis com a água) tais como piridina (Log P = 0,71) ou dimetilformamida (Log P = -1,0). O uso de solventes imiscíveis com a água é inviável para a catálise enzimática, pois não ocorre nenhuma interação entre o açúcar insolúvel e a enzima também insolúvel. De modo similar, compatibilidade dos produtos da reação enzimática com o solvente é crucial. Produtos polares tendem a permanecer na camada de água em torno da enzima e isto causará inibição ou reações secundárias indesejáveis. Esta situação foi encontrada na catálise de fenóis pela *polifenoloxidase* em hexano¹¹ (Log P = 3,50) e na oxidação do álcool benzílico pela *álcool oxidase*, também em hexano⁵⁹. No primeiro caso, os produtos polares gerados (*o*-quinonas) são insolúveis em hexano e rapidamente se polimerizam no ambiente aquoso próximo a enzima, provocando a sua inativação. Em um solvente mais polar como o clorofórmio (Log P = 2,0), os produtos se distribuem por todo o solvente e não inativam a enzima^{11,60}.

Apesar da ampla utilização do Log P como parâmetro para ser relacionado com a atividade enzimática, algumas discrepâncias têm sido relatadas^{61,62}. Reslow et al.⁶³, mostraram que a inclusão do parâmetro solubilidade de Hildebrand (δ) em água ajudava na relação solvente orgânico/atividade enzimática. Valivety et al.⁶⁴, mostraram que a atividade catalítica era melhor

relacionada como uma função não só do Log P mas também com o índice de aceitação de elétrons ou polarizabilidade. Posteriormente, Wehtje⁶⁵ e Yang e Robb⁶⁶ verificaram que não havia nenhuma relação satisfatória entre a atividade do biocatalisador e o Log P.

Outras propriedades do solvente têm sido relacionados com a atividade enzimática. Por exemplo, a atividade da *álcool desidrogenase* aumentou com a diminuição da constante dielétrica do solvente⁶⁷ e uma relação linear foi observada entre a atividade da *lipase* e o Log Sw/o (solubilidade molar da água em um solvente)⁶⁸.

Pelos aspectos apresentados, pode-se concluir que ainda não há um parâmetro quantitativo confiável que possa refletir as múltiplas interações entre enzima-solvente orgânico que permita prever, com sucesso, a atividade biocatalítica ótima em meio não aquoso.

Vários autores têm buscado essa solução. Schneider⁶⁹ propôs um parâmetro de solubilidade tridimensional pela combinação dos parâmetros Log P, δ e ligações por pontes de hidrogênio. Khmelnitzky et al.⁴⁶, desenvolveram um modelo matemático denominado "capacidade desnaturante" que relaciona algumas características físico-químicas do solvente orgânico, tais como hidrofobicidade, capacidade de solvatação e geometria molecular. Batra e Gupta⁷⁰, mediram as atividades da *polifenoloxidase*, *peroxidase*, *fosfatase* ácida e *tripsina* na presença de diferentes solventes e constataram que a variação na atividade enzimática com a natureza do solvente não está relacionada com o Log P nem com a capacidade desnaturante.

É possível que estudos futuros, envolvendo um grande número de proteínas de natureza diferentes (por ex., proteínas com estrutura quaternária), possam introduzir parâmetro(s) que possibilite(m) a otimização das concentrações limites dos solventes orgânicos que retenham e/ou maximizem a atividade e a estabilidade do biocatalisador em sistemas bifásicos.

pH e alteração da especificidade enzimática

Entre as questões intrigantes referentes a ação das enzimas em solventes não-aquosos encontra-se o pH. Todas as reações enzimáticas em água são fortemente dependentes do pH visto que o estado de ionização da enzima é essencial para a catálise. Desde que protonação e desprotonação da enzima raramente ocorrem de maneira perceptível em um meio orgânico, como a enzima reconhece o pH em solventes orgânicos anidros? A resposta é um tanto inusitada: a enzima "recorda-se" do pH da última solução aquosa a que foi exposta e isto tem sido chamado de "memória de pH"^{41,71}. A nível molecular, os grupos ionogênicos da molécula enzimática adquirem uma certo grau de ionização na solução aquosa a um dado pH - e a atividade enzimática correspondente a este pH - que é mantido sem modificação nos solventes orgânicos como também no estado sólido.

Esta maneira, a capacidade tamponante do microambiente aquoso deve ser controlada e algumas substâncias como hidrocloreto de trisocetilamina e ácido trifenil acético (sal sódico)⁷² têm sido adicionadas às soluções aquosas que vão ser liofilizadas ou introduzidas na fase orgânica. A perda da "memória de pH" na hidratação pode ser atribuída a redistribuição de cargas na superfície da proteína.

Tem sido registrado que a liofilização da α -*quimotripsina* em soluções aquosas contendo certos ligantes (N-acetil-*l*-fenilalanina) tem efeitos significativos sobre a atividade catalítica desta enzima em fase orgânica. Foi observado um aumento de até 35 vezes na sua atividade quando liofilizada na presença daquele ligante²⁷. Efeitos similares têm também sido documentados para *subtilisina*⁷³ e de novo, mais recentemente, para *quimotripsina*^{74,75}. Esse aumento na atividade deve-se ao efeito "fechadura" entre ligante e enzima tendo como resultado uma conformação enzimática mais ativa. A enzima assume uma nova conformação quando ocorre a sua união com o ligante

que é complementar para aqueles substratos com a mesma estereoquímica. Esta conformação é "congelada" - torna-se rígida - e permanece quando a enzima é transferida para um solvente orgânico, visto que a mobilidade das moléculas de enzima é muito menor neste meio do que na água⁷⁶.

Esse fenômeno permitiu o desenvolvimento da técnica de "moléculas impressas" (molecular imprinting) de Stahl et al.⁷⁴ e de Braco et al.⁷⁷. O trabalho de Braco et al.⁷⁷ mostrou que a albumina de soro bovino, quando liofilizada a partir de uma solução aquosa contendo ácido *p*-hidroxibenzoico ou ácido *l*-tartárico, desenvolveu uma afinidade específica para estes ligantes quando em solventes orgânicos anidros. Por outro lado, Stahl et al.⁷⁴ mostraram que usando um sistema similar, a α -quimotripsina pode se tornar acceptora de derivados do *d*-aminoácido.

O mais importante desse fenômeno é a sua possível utilização na preparação de uma enzima, em meio orgânico para análise. Assim, uma alteração da especificidade enzimática pode ser obtida em favor de um particular analito se a enzima for liofilizada na presença de uma solução aquosa concentrada deste analito. Zaks e Klibanov¹⁰ comprovaram que a *lipase* pancreática suína, em meio aquoso reage, indiferentemente com substratos pequenos ou grandes enquanto que a enzima desidratada, em meio orgânico, não reage com moléculas grandes (álcoois terciários), presumivelmente, devido a rigidez do seu centro ativo que não pode mais ser aberto para acomodá-las.

Estabilidade térmica de enzimas em solventes não-aquosos

As moléculas de água, que se encontram em torno da molécula enzimática nas soluções aquosas, exercem um papel importante na estabilidade protéica devido, principalmente, às interações hidrofóbicas⁷⁸⁻⁸⁰ além das forças de van der Waals, pontes salinas e pontes de hidrogênio⁸¹. Desta maneira, todas as reações que provocam termoinativação irreversível de enzimas envolvem água livre^{82,83} e a desnaturação, induzida pelo

calor, necessita de uma ampla mobilidade conformacional. Assim, não é surpresa que a manipulação da natureza do meio e da quantidade de água em torno da enzima tem um profundo efeito sobre sua estabilidade.

A remoção de água da superfície da proteína, indubitavelmente, diminui os efeitos hidrofóbicos provocando a sua desestabilização. Isto conduz a uma reorganização das moléculas de água devido ao incremento do número de ligações intramoleculares por pontes de hidrogênio⁷⁸ que contribui para a estabilização e aumento da rigidez da proteína. O componente predominante destas ligações intramoleculares é eletrostático. Logo, a estabilidade dessas ligações deve aumentar em solventes com baixa constante dielétrica.

Quando proteínas são expostas a temperaturas elevadas por um período prolongado, elas sofrem um processo de desenrolamento que expõe os grupos reativos e áreas hidrofóbicas mais internas, acarretando modificações químicas irreversíveis, o desordenamento monomolecular e agregação. Os processos químicos que freqüentemente levam à inativação (altamente acelerados em temperaturas elevadas) são a deamidação dos resíduos de asparagina e glutamina, hidrólise das ligações peptídicas nos resíduos de ácido aspártico, permuta dissulfeto-tiol, destruição de ligações dissulfeto, oxidação de cisteínas, isomerização de prolinas, glicação de aminogrupos e outros processos químicos⁸⁴. Todos esses processos exigem a participação de água e, portanto, não devem ocorrer em um microambiente livre de água como nos solventes orgânicos anidros.

Inúmeros autores têm demonstrado que suspensões enzimáticas em solventes orgânicos anidros exibem termoestabilidade bem superior do que aquelas em soluções aquosas. Alguns exemplos estão agrupados na Tabela 6. Um exemplo bastante ilustrativo da significativa diferença de termoestabilidade entre meio aquoso e meio orgânico é o caso da *tirosinase*. Esta enzima possui uma vida média, a 50°C, nove vezes superior em clorofórmio do que em solução aquosa.

Reslow et al.⁶³ (*a*-quimotripsina desidratada imobilizada

Tabela 6. Estabilidade térmica de enzima, em meios não-aquosos e aquosos.

Enzima	Condições	Propriedade térmica ^a	Referências
<i>Álcool desidrogenase</i>	heptano, 5°C	t _{1/2} > 50 dias	88
<i>β-glicosidase</i>	propanol-2, 50°C, 30h	retém 80% da atividade	90
<i>Citocromo oxidase</i>	tolueno, 0,3% água, 70°C tolueno, 1,3% água, 70°C	t _{1/2} 4,0 h t _{1/2} 1,7 min	93
<i>Fosfatase ácida</i>	hexadecano, 80°C MA, 70°C	t _{1/2} 8 min t _{1/2} 1 min	92
<i>F1-ATPase</i>	tolueno, 70°C MA, 70°C	t _{1/2} > 24 h t _{1/2} < 10 min	87
<i>Lipase (Candida)</i>	tributirina/heptanol, 100°C MA, pH 7,0, 100°C	t _{1/2} 1,5 h t _{1/2} < 2 min	10
<i>Lipase lipoproteica</i>	tolueno, 90°C, 400 h	retém 40 % da atividade	89
<i>Lipase pancreática suína</i>	tributirina, 100°C MA, pH 7,0, 100°C	t _{1/2} < 26 h t _{1/2} < 2 min	10
<i>Lisozima</i>	ciclohexano, 110°C MA, 110°C	t _{1/2} 140 min t _{1/2} < 10 min	86
<i>α-quimotripsina</i>	octano, 100°C MA, pH 8,0, 55°C	t _{1/2} 80 min t _{1/2} 15 min	27 85
<i>Ribonuclease</i>	nonano, 110°C, 6 h MA, pH 8,0, 90°C	retém 95 % da atividade t _{1/2} 80 min	84
<i>Subtilisina</i>	octano, 110°C	t _{1/2} 80 min	73
<i>Tirosinase</i>	clorofórmio, 50°C MA, 50°C	t _{1/2} 90 min t _{1/2} 10 min	91

(MA) = meios aquosos; a) t_{1/2} = tempo necessário para que a enzima perca 50% de sua atividade enzimática.

sobre superfície porosa de vidro) e Zaks e Klivanov^{10,27} (*lipase, a-quitripsina e subtilisina* liofilizadas) concordam em que a estabilidade térmica é fortemente dependente da hidrofobicidade do solvente. Na presença de apenas 1,0% de água no meio orgânico, a estabilidade da *lipase* aproxima-se da sua estabilidade em meio aquoso. Isto significa que a estrutura da enzima permanece inalterada (enrolada) em meio orgânico, mesmo em altas temperaturas. A água exerce papel relevante em tais processos, aumentando de forma significativa a flexibilidade conformacional das enzimas. Zaks e Klivanov¹⁰ demonstraram que a *lipase* pancreática de suínos em solução aquosa a 100°C foi completamente inativada em menos de dois minutos, ao passo que nesta mesma temperatura, mantém elevada atividade por várias horas, se o percentual de água presente não ultrapassar 0,4%, como pode ser visto na Figura 3.

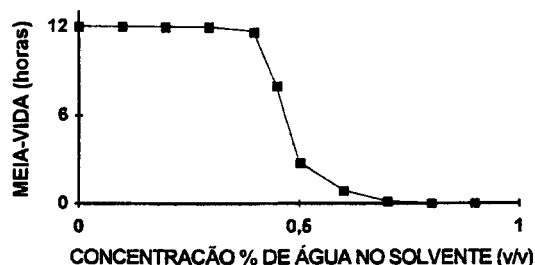


Figura 3. Inativação da lipase pancreática suína, a 100°C, em uma solução de tributirina em heptanol, na presença de diferentes concentrações de água¹⁰.

Biossensores, em geral, operam em temperaturas ótimas para que a reação biocatalítica se processe rapidamente e tenha grande sensibilidade. Entretanto, em muitos casos, a temperatura ideal para a reação enzimática ocorrer não coincide com a condição mais favorável para os demais parâmetros envolvidos no processo. O aumento da estabilidade térmica das enzimas proporcionada pelos solventes orgânicos é uma vantagem importante do ponto de vista operacional da enzima, ampliando o intervalo de temperatura onde ocorre um dado processo químico de interesse.

APLICAÇÕES ANALÍTICAS DE ENZIMAS EM MEIOS NÃO-AQUOSOS

O principal impulso da química industrial moderna é a busca incessante de maior especificidade nos processos bioquímicos. A falta de seletividade resulta em aumento de custos advindo dos processos de separação, purificação e tratamento de resíduos. Por outro lado, o conhecimento de que enzimas são específicas e podem funcionar vigorosamente em sistemas anidros ou com baixo conteúdo de água, tem proporcionado variadas transformações de importância biotecnológica. Klivanov^{94,95}, Dordick⁹⁶ e Tanaka e Kawamoto⁹⁷ têm revisado as inúmeras aplicações de tais sistemas. Uma lista da natureza de tais aplicações é mostrada na Tabela 7.

Apesar dessas limitações, aplicações e vantagens de dispositivos bioanalíticos baseados em enzimas (biossensores enzimáticos) que funcionam em fase não-aquosa têm sido demonstradas solucionando diversos problemas analíticos de indústrias de alimentos, de bebidas, farmacêuticas, petroquímicas, militar e de cosméticos, além do seu emprego na agricultura e nos diagnósticos clínicos.

Antes dessa exploração, somente uns poucos sensores enzimáticos operavam em meios não aquosos. As enzimas eram mantidas em um compartimento aquoso separadas do meio orgânico por uma membrana permeável seletiva. Um exemplo desse tipo de sensor foi idealizado pela Phillips Petroleum para a determinação do conteúdo de álcool na gasolina²¹. Ele

consistia de um eletrodo de oxigênio onde a *álcool oxidase* se encontrava imobilizada na extremidade e mantida adequadamente hidratada por uma membrana externa semi-permeável. O álcool no meio aquoso poderia atravessar essa membrana e na camada onde se encontrava a enzima hidratada era biocataliticamente oxidado. A diminuição concomitante da concentração de oxigênio era medida amperometricamente. Em outros casos, a solubilidade do analito insolúvel em água era aumentada pelo uso de detergentes. Isso, normalmente, acarretava perda de sensibilidade do sensor tanto pela insolubilidade do analito em água como devido ao próprio detergente. Entretanto, se a enzima era capaz de funcionar em uma fase predominantemente orgânica, então analitos de baixa solubilidade em água poderiam estar em altas concentrações para a bioanálise. Independente dessa característica - aumento de solubilidade - os biossensores em fase orgânica podem oferecer outras vantagens que são mostradas na Tabela 8.

Hall et al.^{125,126} descreveram, em 1988, o primeiro biossensor no qual o biocatalisador estava em contato direto com a fase orgânica, para a determinação amperométrica de fenóis em clorofórmio. Neste solvente, a *polifenoloxidase* catalisava a conversão do composto fenólico a benzoquinona, que era eletroquimicamente reduzida em eletrodo de carbono vítreo a -275 mV (vs ECS).

Algumas aplicações dos sensores enzimáticos, anticorpos e de compostos com características similares à dos anticorpos (antibody mimics) em ambientes aquo-restritos desenvolvidas nos anos recentes serão, a seguir, brevemente discutidos.

Eletrodos enzimáticos de fase orgânica

Nos últimos oito anos, uma considerável atenção tem sido dada à pesquisa e ao desenvolvimento de biocatalisadores de fase orgânica para serem utilizados em síntese, no processamento industrial e, particularmente, como ferramenta analítica nos testes de controle de qualidade. Estes biossensores podem ser usados para a detecção, direta e específica, de analitos hidrofóbicos de uma variedade de amostras complexas que se tornam acessíveis ao microambiente enzimático devido ao meio orgânico.

Muitos dos recentes avanços nesta área têm sido obtidos utilizando-se técnicas de detecção eletroquímica que se expandiram durante as décadas de 60 e 70 usando eletrodos convencionais e solventes tais como dimetilformamida, acetonitrila, carbonato de propileno e dimetilsulfóxido. Estes solventes possuem algumas características importantes: constantes dielétricas baixas, a capacidade de solubilizar analitos orgânicos e alguns compostos inorgânicos, resistência à oxidação e à redução (ampliando a faixa de potencial de trabalho) e, geralmente, boas características de estocagem. Uma abordagem sobre eletroquímica em fase orgânica pode ser encontrada em Saini et al.²¹.

Com o desenvolvimento da tecnologia dos biossensores, outras técnicas de transdução, além da eletroquímica, têm sido exploradas. Parâmetros tais como oxigênio, gás carbônico, peróxido de hidrogênio e pH são comumente detectados nas reações biocatalíticas. Para esses e outros parâmetros, uma ampla variedade de métodos e ou sensores espectrofotométricos (absorbância, reflectância, fluorescência, fosforescência e quimo/bioluminescência), calorimétricos, piezelétricos e de sensores não catalíticos, são exequíveis. Dessa maneira, a expansão da tecnologia de biossensores pode permitir o aumento potencial de suas aplicações em fase orgânica e seu uso certamente beneficiará áreas tais como a tecnologia de alimentos, diagnóstico clínico e o controle de contaminação de águas. Muito tem que ser realizado para o desenvolvimento desses novos biossensores para adequá-los a outros métodos de análise que não os eletroquímicos. Recentemente, Díaz-García e Valencia-González¹²⁷, revisaram o emprego de sensores ópticos em meio não-aquosos, ao passo que Wang e col.¹²⁸ deram principal

Tabela 7. Algumas aplicações da enzimologia em meios não aquosos.

Aplicação	Exemplo	Referência
Síntese Orgânica		
- Síntese de peptídeos		
	síntese de um peptídeo precursor da penicilina G usando <i>lipase</i>	98
	incorporação de D-aminoácidos em peptídeos usando a <i>subtilisina</i>	99
	formação de ligação isopeptídica em <i>protease</i> e <i>lipase</i>	100
	síntese de dipeptídeo catalisada por <i>lipase</i>	101
	uso de α - <i>quimotripsina</i> e de <i>termolisina</i>	102
	uso de <i>termolisina</i> para sintetizar um precursor do aspartame	103
	estudo comparativo de solventes miscíveis e imiscíveis em água	104
	utilizando a α - <i>quimotripsina</i>	
	especificidade nucleófila e engenharia de meio usando a α - <i>quimotripsina</i>	105
	emprego da <i>subtilisina</i>	106-107
	emprego da α - <i>quimotripsina</i>	108
	aplicação de PEG ^a -modificadas .	109
- Sínteses régio- / estereosseletiva		
	acilação regiosseletiva de glicóis pela <i>lipase</i>	110
	acilação regiosseletiva de açúcares pela <i>lipase</i>	111
	resolução de misturas racêmicas de ácidos pela <i>lipase</i>	112
	óxido-reduções assimétricas pela <i>álcool desidrogenase</i> para produção de álcoois e cetonas quirais	12
	síntese de cianohidríns quirais usando <i>maldelnitrila liase</i>	113
	acilação regiosseletiva de carboidratos pela <i>subtilisina</i> em dimetilformamida anidro	42
	síntese enantio- e regiosseletiva de álcoois, derivados do glicerol,	114
	açúcares e organometálicos usando <i>lipases</i>	
	interesterificação regioespecífica de triacilglicerol pela <i>lipase</i>	115
	síntese de biossurfactantes usando <i>lipase</i>	116
		117-118
		119
Quebra de gorduras		
	Lipólise solventes orgânicos usando <i>lipases</i>	120-122
Análise		
	Determinação de colesterol em solventes orgânicos	26
	<i>Peroxidase</i> comum substrato cromogênico	123
Oligomerização e polimerização		
	Polimerização de fenóis pela <i>peroxidase</i>	124

a- Polietileno glicol

Tabela 8. Vantagens dos biossensores em fase orgânica.

Características	Vantagens
- Biocatálise em meios não aquosos	- Aumento do número de analitos a serem determinados pelos biossensores
- Modificação na especificidade do substrato para algumas enzimas induz a novas reações biocatalíticas	- Novos detectores
- Aumento da estabilidade térmica das enzimas	- Aumento da estabilidade operacional do biossensor
- Diminuição da contaminação microbiana	- Melhora a vida útil operacional do biossensor
- Resistência à oxidação e à redução em solventes orgânicos	- Amplia a janela do potencial para reações que transferem elétrons
- Baixa solubilidade de espécies eletroativas aquosas	- Diminuição da interferência de espécies hidrofílicas
- Habilidade das enzimas de permanecerem ativas em estados essencialmente desidratados	- Ausência de água pode facilitar a construção de sensores
- Solubilidade alterada dos reagentes	- Novas opções para o "design" de dispositivos estáveis
- Tolerância à baixas temperaturas em meio orgânico superior à observada em meio aquoso	- Aumento da sensibilidade de termistores enzimáticos

ênfase aos sensores eletroquímicos. A Tabela 9 reúne os transdutores mais utilizados e possíveis aplicações.

Apesar do amplo emprego de enzimas isoladas como componente biológico, preparações de células íntegras de microrganismos e de fontes vegetais e animais têm sido também propostas como elementos biocatalíticos dos biossensores. Tais materiais simplesmente mantêm a enzima de interesse em seu ambiente natural resultando em uma estabilização da atividade enzimática desejada¹³⁷, sem sacrificar, em muitos casos, a sua seletividade.

Os biossensores de tecidos vegetais podem ser construídos pela retenção física de fatias muito finas do tecido na superfície de um elemento de detecção usando uma membrana porosa. Outra maneira de utilização desse material é a distribuição homogênea do tecido vegetal, picado, em reatores de geometria própria, para operarem em sistemas em fluxo¹³⁸.

Diversos exemplos de aplicações recentes dos eletrodos enzimáticos em fase orgânica estão listados na Tabela 10.

Uma outra aplicação dos biossensores baseia-se na possibilidade do uso de mediadores insolúveis em solventes orgânicos (podem ser co-imobilizados com a enzima por adsorção) obtendo-se os chamados sensores sem reagentes. Schubert et al.¹³⁰, exploraram a oxidação do íon hexacianoferrato(II) pelo peróxido de hidrogênio na presença de *peroxidase* em vários solventes orgânicos. A forma oxidada desse íon era novamente reduzida em eletrodo de grafite em potencial próximo de zero permitindo assim a quantificação de peróxido de hidrogênio. Recentemente, Stancik et al.¹⁴⁹ desenvolveram um biossensor baseado em um eletrodo de Clark acoplado a uma camada

biocatalítica contendo *tirosinase*. Derivados da tiouréia foram detectados em hexano e o método mostrou-se altamente sensível com limites de detecção no intervalo de 13 - 181 nmol L⁻¹, dependendo da estrutura do composto inibidor.

Há numerosas oportunidades do emprego de biossensores em fase orgânica em sistemas de análise em fluxo. Recentemente, em uma revisão, Wang e col.¹⁵⁰ discutiram as vantagens de tal metodologia. Em tais sistemas, além dos benefícios já mencionados da enzimologia em meio não-aquoso, há rapidez na análise de amostras complexas sem a necessidade de pré-tratamentos, tornando-os atrativos para testes de controle de qualidade e de processos industriais. Algumas aplicações recentes desses biossensores podem ser encontradas baseadas, principalmente, no uso de *oxidases* e *desidrogenases (polifenoloxidases, álcool desidrogenases e peroxidases)*¹⁵¹⁻¹⁵⁵.

A utilização de tecidos vegetais como fonte de material enzimático para aplicações em meio orgânico também foi explorada pelos autores¹³⁸. O mesocarpo fibroso do coco-da-baía (*Cocos nucifera*, L.) e frutas da palmeira-leque (*Latania* sp) em meio orgânico apresentam excelente desempenho para a detecção de dihidroxifenóis, mas são altamente dependentes da quantidade de água ligada à enzima. Na figura 4-A são apresentados os picos e a respectiva curva de calibração, correspondentes à injeções de soluções contendo 1 x 10⁻⁴ M de catecol e concentrações crescentes de água. Um comportamento bastante linear (r = 0,997) é verificado em função do incremento percentual da quantidade de água, entre 0,1 e 0,8 % (v/v). O incremento do sinal torna-se menos pronunciado para

Tabela 9. Tipos possíveis de biossensores em meio orgânico e seus transdutores.

Base	Tipo	Aplicações	Referência
Eletroquímica	Amperométricos:	Fenol e derivados	125,126,128
		Colesterol	129
		Peróxido	130,131
	Potenciométricos:	Detecção da síntese de éster	132
Calorimétrico	Termistores:	Reações da <i>lipase</i> e da <i>peroxidase</i>	133
		Reações da <i>glucose oxidase</i> e <i>catalase</i>	134
		Imunossensores	135
Ópticos	Uso de cromógenos associados com enzimas:	Colesterol	26
		Sensoriamento de temperatura	123
		Análise de gases tóxicos	136

Tabela 10. Exemplos de aplicações recentes de eletrodos enzimáticos que operam em fase orgânica.

Enzima	Solvente	Analito	DetectoR	Ld ^a	Referência
<i>Peroxidase</i>	Dioxano	H ₂ O ₂	EC ^b	10	132
	Etanol	Peróxidos orgânicos	µEC ^c	1	141
	Acetonitrila	H ₂ O ₂	EC ^{b,d}	0,0003	142
<i>Tirosinase</i>	Acetonitrila	Sulfetos orgânicos	EP ^e		143
	Etanol	Fenóis	µEC ^c	0,7	141
	Acetonitrila	Fenóis	EC ^{b,d}	0,0001	142
	Vários	Fenóis	EO ^f	0,0002	144-145
	Acetonitrila	Umidade	PC ^g	0,072%(v/v)	146
<i>Glucose oxidase</i>	Acetonitrila	Glicose	ECV ^h		147
<i>Polifenol oxidase</i>	Clorofórmio	Fenóis	EG ⁱ	0,03	148
	Acetonitrila	Umidade	ECV ^g		140
<i>Colesterol oxidase</i>	Hexano/clorofórmio	Colesterol	EO ^f		149
<i>Lacase</i>	Álcoois	Hidroquinona	ECV ^g	0,0006	150

a. Limite de Detecção (mmol L⁻¹); b. eletrodo de carbono; c. microeletrodo; d. enzima ocluída em membranas de poliéster sulfônico; e. eletrodo de platina; f. eletrodo de oxigênio; g. pasta de carbono; h. eletrodo de carbono vítreo; i. eletrodo de grafite.

quantidades maiores de água. Tais resultados permitem avaliar a quantidade de água contida em um solvente, que para o presente caso, a reta extrapolada indica a presença de 0,03% (v/v) de água na acetonitrila utilizada. A elevada reprodutibilidade do método pode ser verificado pela realização de injeções repetitivas de amostra. Para 44 injeções sucessivas de uma solução contendo 5×10^{-4} M de catecol e 0,7% (v/v) de água, respostas altamente repetitivas foram obtidas (C.V. = 0,65%) apesar de ocorrer uma pequena deriva da linha base. A alternância de amostras contendo respectivamente 0,1 e 0,8% de água, demonstra a notável adequação da atividade enzimática, em função do conteúdo de água, não havendo nenhum efeito de "memória" em relação às injeções anteriores, como pode ser visualizado na Figura 4-B.

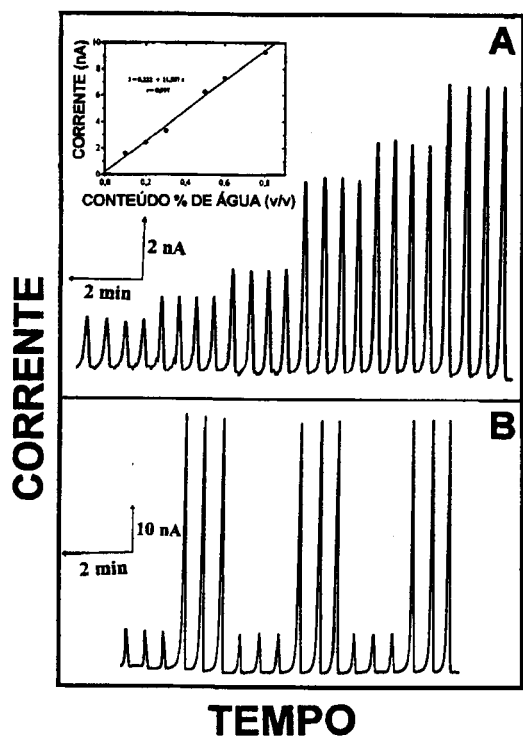


Figura 4. Análise de catecol em acetonitrila. (A) Injeções sucessivas de soluções 1×10^{-4} mol L^{-1} de catecol em meio de acetonitrila contendo 0,1% (a); 0,2% (b) 0,3% (c); 0,5% (d); 0,6% (e) e 0,8% (f) de água (v/v). (B) Injeções de 5×10^{-4} mol L^{-1} de catecol em acetonitrila contendo 0,1% (a) e 0,8% (b) de água (v/v). Eletrólito suporte: Cloreto de benzalcônio $0,05$ mol L^{-1} .

Reatores com o mesocarpo fibroso do coco, utilizados em meio de acetonitrila, mostraram estabilidade muito superior àqueles mantidos em meio aquoso. O monitoramento indireto da água deverá ser utilizado para determinação de umidade de produtos com baixos teores de umidade. Estão em andamento experimentos utilizando tais tecidos, tanto em meio aquoso como em fase orgânica, visando a quantificação de inibidores enzimáticos.

Análises em bateladas

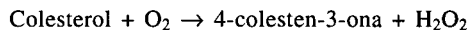
Diversos pesquisadores^{26,123} realizaram determinações em bateladas onde a enzima era diretamente introduzida em um meio não-aquoso e o produto formado monitorado pelo aparecimento de cor. Kazandjian et al.²⁶ utilizaram *colesterol oxidase* agregada com *peroxidase* (ambas as enzimas adsorvidas em superfícies de vidro poroso) com *p*-anisidina como substrato cromogênico, em diferentes solventes orgânicos, visando a análise de colesterol. Boeriu et al.¹²³, dispersaram, homogeneamente, a *peroxidase*

em misturas de parafina solidificável contendo cromógeno (o ponto de fusão era selecionado pela variação desta composição) como um protótipo de um sensor para temperaturas abusivas aplicável a materiais alimentares, farmacêuticos e termo-sensíveis. Com o aumento da temperatura, alterava-se a fase do meio, diminuindo as barreiras difusionais, facilitando assim a catálise enzimática. Como resultado ocorria modificação de cor que era monitorada visualmente.

Reatores enzimáticos que operam em sistemas analíticos em fluxo

Braco et al.¹⁵⁶, foram os primeiros a realizar uma avaliação sistemática das possibilidades de implementação de sistemas analíticos em fluxo empregando solventes orgânicos. Esses autores adaptaram, para condições em fluxo, a análise para colesterol. Neste trabalho, a viabilidade de utilização de um reator bienzimático imobilizado não covalentemente para determinações em fluxo em meio anidro (tolueno) com detecção espectrofotométrica foi demonstrada, com a vantagem de apresentar ainda um notável melhoramento em relação ao sistema em batelada. Com esse sistema, os autores obtiveram respostas lineares de 1×10^{-6} até $1,8 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} de colesterol, com uma frequência analítica de 60 amostras por hora. Em adição, tais reatores puderam ser utilizados por até 4 meses, período muito superior ao alcançado em meio aquoso.

Outro sistema em fluxo, útil para a determinação de colesterol em alimentos (limite de detecção de 5×10^{-5} mol L^{-1}) foi idealizado por Valencia-González e Diaz-García¹⁵⁷. Esse sistema consiste de materiais bioativos - *colesterol oxidase* e *peroxidase* - co-imobilizados sobre vidro poroso, em associação com uma resina aniônica carregada com material fluorescente, sensível à oxigênio. A quantificação de colesterol neste caso foi obtida de forma indireta, via diminuição de fluorescência, provocada pelo consumo de oxigênio, quando da reação enzimática:



O peróxido de hidrogênio gerado é consumido, concomitantemente, objetivando prevenir a inativação da *colesterol oxidase*¹⁴⁰ e favorecer a reação anterior.

Biossensores enzimáticos em fase gasosa

Outro sistema que explora a biocatálise em ambientes aquo-restritos envolve a condução da catálise enzimática com reagentes na fase gasosa. O uso dessa nova técnica pode, em futuro bastante próximo, ser aplicável em diferentes áreas, dentre as quais:

- Remoção de compostos tóxicos de gases residuais¹⁵⁸.
- Produção de compostos voláteis - fragrâncias e aromas para as indústrias de alimentos, de cosméticos e perfumaria.
- Aplicações analíticas envolvendo biossensores.

Apesar das enormes possibilidades de aplicações em processos biotecnológicos, comprovadas pela eficiência catalítica, produtividade e exequibilidade técnica, pesquisas fundamentais são necessárias para estabelecer os parâmetros que afetam a cinética e a produtividade desse sistema.

O principal problema para muitas reações de potencial interesse comercial é a obtenção de substratos e/ou produtos na fase gasosa. Dois fatores devem ser levados em consideração. O primeiro, refere-se a temperatura e pressão absoluta do sistema, parâmetros físicos que afetam a pressão de vapor dos diferentes componentes do sistema. Com isso, pode-se alterar a atividade do biocatalisador pelo comprometimento da concentração dos componentes na fase gasosa, além da sua estabilidade. O segundo fator, é a atividade de água (parâmetro termodinâmico), item amplamente discutido em páginas anteriores. As condições de operação desse sistema são similares aos da enzimologia em meio orgânico.

As enzimas mais empregadas em bioreatores sólido-gás incluem as *hidrogenases*^{159,160} (onde o substrato é hidrogênio), *álcool oxidase*¹⁶¹⁻¹⁶³ (oxidação do etanol), *álcool desidrogenases*^{164,165} (produção de álcool e/ou aldeído) e enzimas lipolíticas - *lipases* e *cutinase*¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ (hidrólise de ésteres) - onde são suspensas em misturas de vapor de água e do substrato.

Bioreatores nos quais o biocatalisador consiste de microrganismos intactos têm sido usados em transformações visando a remoção de produtos tóxicos. A utilização de microrganismos em tais sistemas é bem mais promissora devido a sua habilidade de regenerar *in situ* os cofatores envolvidos na catálise por enzimas tais como as *oxidases*. Os microrganismos imobilizados que têm sido utilizados nesses sistemas são *Mycobacterium* PY1¹⁷⁰, *Xanthobacter* PY2¹⁷⁰, *Methylosinus* sp¹⁷¹, *Methylocystis* sp¹⁷², *Pichia pastoris*^{173,174} e *Saccharomyces cerevisiae*¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

Há poucos exemplos de pesquisas detalhadas sobre a aplicação de biossensores para a análise direta de substratos ou inibidores no estado gasoso. Algumas aplicações analíticas de biocatalisadores em fase gasosa foram realizadas por Guilbault¹⁷⁸. Estes autores demonstraram que formaldeído pode ser analisado em fase gasosa usando a *formaldeído desidrogenase*, imobilizada sobre um cristal piezelétrico (CPZ), juntamente com os cofatores NAD⁺ e glutatona reduzida. Este método é muito sensível (detecção de 1-100 ppm de formaldeído) e altamente específico.

Imobilizações da *colinesterase*¹⁷⁹ e de anticorpos¹⁸⁰ (ver item seguinte) imobilizados sobre CPZ têm sido utilizadas na detecção de pesticidas organofosforados em nível de ppb. Respostas rápidas (2-3 min) foram obtidas e o tempo de recuperação foi da ordem de 1-2 min. Estes resultados evidenciam aplicações mais frequentes e promissoras para os CPZ como sensores imunológicos em fase gasosa. Entretanto, os parâmetros que afetam o desempenho desses dispositivos devem ser identificados e otimizados antes que sejam comercializados.

Outra estratégia tem sido empregada por Barzana et al.^{162,163} para a análise de etanol na respiração ou de formaldeído no ar. O dispositivo consiste de uma mistura de enzimas desidratadas (*álcool oxidase* e *peroxidase*) dispersas em um suporte de celulose, contendo também o cromóforo 2,6-dicloroindofenol. O produto da reação enzimática reage com o cromóforo adsorvido, dando origem a um composto altamente colorido que indica semi-quantitativamente a concentração de álcool na respiração.

Mitsubayashi et al.¹⁸¹, construíram um eletrodo com a *álcool oxidase* imobilizada por oclusão que exibiu alta seletividade para o etanol na presença de outros gases. Os autores demonstraram que o dispositivo é aplicável no monitoramento do álcool, expelido pela respiração, de indivíduos que ingeriram bebidas alcoólicas.

A rotina para a determinação de gases é uma prática recomendável em ambientes onde substâncias tóxicas (NH₃, Cl₂, CO, H₂S, HCN), "irritantes nervosos" (fosgênio), anestésicos (N₂O), inflamáveis (CH₄, propano, etano), vapores orgânicos (hidrocarbonetos, óxido de etileno, dissulfeto de carbono, formaldeído) e vapores inorgânicos (mercúrio) podem ocorrer. A máxima concentração de exposição recomendada à muitas dessas substâncias situa-se na faixa de ppm ou mesmo de ppb; assim, métodos de detecção com suficiente sensibilidade são necessários. As análises desses gases mediadas por enzimas podem representar uma alternativa simples, rápida e de baixo custo, se comparada às metodologias convencionais. Um requisito adicional desejável é que esses dispositivos analíticos devem ser suficientemente robustos para que possam ser utilizados fora do laboratório, em estudos no campo.

Imunossensores em meio não-aquoso

Imunossensores são definidos como dispositivos analíticos que detectam a ligação de um antígeno (AG) ao seu anticorpo (AC) específico. O produto da reação imunológica na superfície do transdutor é monitorada e relacionada com a concentração do antígeno.

Os imunossensores têm sido assunto de crescente interesse durante a última década principalmente devido a potencialidade de sua aplicação como alternativa da técnica de imunoenálise.

Sem considerar o transdutor ou a aplicação envolvida, um sistema ideal deve ter as seguintes especificações:

- capacidade de detectar e quantificar o AG, dentro do intervalo de concentração requerido (especificado) em tempo razoavelmente curto (preferentemente em poucos segundos).
- capacidade de "traduzir" o evento da ligação sem a adição de reagentes.
- capacidade de repetir a medida com o mesmo dispositivo (isto é, a reação imunológica - AG-AC com o transdutor - deve ser reversível).
- capacidade de detectar a ligação específica do AG em amostras reais.

Há uma crucial diferença na natureza da ligação do complexo AG-AC com um sistema enzimático. Neste, um substrato se liga ao centro ativo de uma enzima para formar um complexo enzima-substrato, instável e transitório, antes da formação do produto, sendo um processo inteiramente reversível. No curso normal dessa reação, o produto continuamente será formado e liberado do sítio ativo, até que seja estabelecido um equilíbrio. Esta situação é significativamente diferente da ligação AG-AC.

A formação do complexo imuno-AG-AC é "permanente" e essencialmente irreversível (sem aplicação de condições extremas), ocorrendo com uma maior afinidade do que a dos sistemas enzimáticos. Esta falta de formação de produto em uma reação imunológica simplifica seu possível modo de operação em um meio orgânico, já que não depende dos processos de difusão do substrato e do produto (em forma solúvel) a partir do sítio de ligação.

A reação imunológica em um ambiente orgânico oferece diversas vantagens: aumento de solubilidade (melhora o limite de detecção por pré-concentração da amostra); dependendo da polaridade do solvente orgânico empregado, pode ocorrer distorção da estrutura quaternária do complexo AG-AC permitindo a modulação da interação AG-AC (pode torná-la reversível sem comprometimento da conformação funcional do sítio de ligação) podendo ainda resultar em maior estabilidade e intervalo de temperatura operacional.

Dependendo da tecnologia de transdutor empregada (registre-se que não há conversão do analito, mas sim, ligação) imunossensores podem ser divididos em três principais classes: óticos, piezelétricos e eletroquímicos. Além disso, com base no mecanismo de imunoenálise usado, eles podem ser diretos - a reação imunológica é diretamente determinada pela medida das modificações físicas induzidas pela formação do complexo, ou indireta - onde uma espécie que possa ser detectada com elevada sensibilidade está combinada com o AC ou AG de interesse. Uma sensibilidade suficientemente elevada pode ser obtida com imunossensores diretos, apesar da possibilidade de ocorrer processos de adsorção não-específica na superfície de biorreconhecimento, o que se constitui no principal problema em sistemas diretos. Nestes casos, o uso de experimentos adequadamente controlados é fundamental.

O primeiro trabalho sobre a ação de anticorpos em solventes orgânicos anidros foi descrito por Russell et al.¹⁸², em 1989. Neste estudo foi demonstrado que a ligação da 4-amino-bifenila com o anticorpo monoclonal 2E11 imobilizado era forte e específica, não somente em água mas também em uma variedade de meios não-aquosos, incluindo acetonitrila e dioxano. Os autores verificaram que a reação de afinidade processa-se com elevada especificidade. Entretanto, ao contrário da enzimologia em fase orgânica, uma clara preferência por ambientes hidrofílicos é evidenciada pela modificação na constante de dissociação do complexo entre os solventes empregados. Um solvente hidrofílico como o dioxano (Log P = -1,1) tem uma constante de dissociação de $16 \pm 2 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto um

solvente hidrófobo como o 1-pentanol ($\text{Log } P = +1,3$) tem uma constante de dissociação na faixa de $790 \pm 360 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Cristais PZ revestidos com AC foram empregados como sensores imunoquímicos em fase gasosa para a determinação do Paration®. Tais sensores mostraram-se promissores, com resposta rápida, seletiva e reversível, em níveis de ppb com uma vida útil aceitável para AC imobilizados não-covalentemente¹⁸⁰.

Com o advento da tecnologia de hibridoma^{183,184}, tornou-se possível gerar sítios ligantes de AC homogêneos com alta afinidade que reconhecem um grande número de ligantes estruturalmente diferentes. Esses novos AC, predominantemente baseados em estratégias desenvolvidas pela engenharia de proteínas, possuem seletividade bem superior e exibem atividade catalítica. Estes AC catalíticos (ACc) ou abzymas (AZ) têm um valor considerável como ferramentas na bioquímica e na biologia molecular, com potencialidade de aplicação nas áreas de química sintética (produção de agentes terapêuticos ou na síntese de novos materiais farmacêuticos). Algumas publicações têm se dedicado a esta promissora área de pesquisa¹⁸⁵⁻¹⁸⁸.

Janda et al.¹⁸⁹ foram os primeiros autores a registrarem o comportamento de ACc imobilizados tanto em meio aquoso como em solventes orgânicos. Seus resultados evidenciaram que os ACc imobilizados em um suporte inorgânico retêm a mesma atividade e estereosseletividade que exibem em soluções aquosas. Outros autores¹⁹⁰ também mostraram que diferentes AZ podem ser moderadamente ativas gerando uma expectativa otimista sobre as possibilidades de sua implementação no campo analítico.

Técnicas de (bio)impressão molecular de polímeros

O reconhecimento molecular e seus mecanismos fundamentais governam a maioria dos processos biológicos e são, desta maneira, de amplo interesse. Esforços consideráveis têm sido feitos para desenvolver sistemas de reconhecimento sintético específico para uma dada molécula através da modificação das propriedades de anticorpos¹⁹¹ ou de proteínas e enzimas em meios aquo-restritos onde a rigidez da conformação é a base para as novas propriedades.

Com os trabalhos desenvolvidos por Cram¹⁹², Lehn¹⁹³ e Pedersen¹⁹⁴ teve início o desenvolvimento de sistemas de reconhecimento sintético. Tais moléculas, a exemplo de enzimas e especialmente de anticorpos, apresentam características que conferem elevado grau de complementaridade molecular, sendo atribuída à sua estrutura tridimensional a capacidade de reconhecimento molecular com alta seletividade¹⁹³. Paralelamente, tem sido também explorado o uso de sistemas macromoleculares de reconhecimento naturais, tais como ciclodextrinas¹⁹⁵ e, naturalmente, pares de reconhecimento biológico tais como interações AC-AG, efector-receptor e enzima-inibidor.

A idéia de usar uma molécula impressa específica para coordenar a montagem de monômeros sintéticos em torno de uma molécula de interesse, criando assim um sítio reativo com especificidade, vem sendo considerada e discutida há muito tempo. Somente recentemente essa técnica foi suficientemente desenvolvida para a realização desse desafio.

A técnica de impressão molecular segue essencialmente duas diferentes estratégias: (bio)impressão ou indução de memória por ligante (ligand-induced memory) e a formação de polímeros de moléculas impressas (covalente ou não-covalentemente). Considerando a importância que estas técnicas vêm assumindo, tais aspectos serão discutidos a seguir.

Memória induzida por ligantes ou (bio)impressão molecular

A (bio)impressão molecular tem sido aplicada tanto a enzimas como também a proteínas e outras macromoléculas naturais e sintéticas^{73-75, 77, 190, 196} e exploram o aumento exagerado da

rigidez conformacional da macromolécula em um solvente orgânico anidro propiciada pelo fenômeno da "memória enzimática".

A catálise produzida por enzimas reguladoras pode ser modulada pela presença de ligantes, resultando em modificações conformacionais, observadas no caso de diversas enzimas alostéricas¹⁹⁷. Algumas dessas enzimas reagem lentamente à presença de um ligante, assim retendo seu efeito mesmo após o ligante ter sido removido. Tal comportamento depende do alto grau de rigidez da proteína¹⁹⁸. Em água, muitas enzimas não apresentam significativa rigidez, para que retenha a conformação induzida na ausência do ligante. Essa conversão é conseguida em ambiente não-aquoso.

Recentemente, Mingarro et al.¹⁹⁹, introduziram a (bio) impressão de enzimas lipolíticas usando interfaces água-lipídio. O processo se baseia na ativação das enzimas em meio aquoso, seguida de resfriamento e eliminação de água (processo freeze-dry) e sua utilização em meio não-aquoso. Com esta estratégia os autores sugerem que a rigidez conformacional da enzima em meio não aquoso mantém sua conformação, aumentando de forma substancial a acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima. Em certos casos, este procedimento permitiu ativações em meio não-aquoso de duas ou mais ordens de magnitude.

No caso de proteínas não-enzimáticas ou outras macromoléculas, a estratégia consiste de gerar sítios de ligação com o ligante com uma macromolécula não relacionada em solução aquosa. A conformação será preservada após liofilização e lavagem com um solvente orgânico anidro para a retirada do ligante e deve ser mantida em ambiente anidro. Isto permite a obtenção de adsorventes específicos e tem sido utilizado em separações cromatográficas em fase orgânica.

Polímeros de moléculas impressas (covalente ou não-covalente)

Conceitualmente bastante similar mas tecnicamente mais versátil e provavelmente com maiores possibilidades de aplicações analíticas, os polímeros de moléculas impressas (PMI) podem ser gerados com uma seletividade pré-determinada a partir de uma dada molécula modelo. Duas estratégias principais tem sido adotadas: A formação de PMIs por ligações covalentes e por ligações não-covalentes. Modelos bastante ilustrativos destas metodologias podem ser vistos no trabalho de Mosbach²⁰⁰.

Em ambos os casos, para a obtenção de moléculas impressas, os monômeros funcionais são polimerizados na presença de uma molécula modelo, por interação entre seus grupos funcionais. Esta molécula modelo será a responsável pelas características do polímero. No caso covalente, há a reversibilidade desta ligação entre a molécula impressa e o monômero. Na abordagem não-covalente, um coquetel de monômeros funcionais aglutinados em torno da molécula principal por interações não-covalentes (iônicas, pontes de hidrogênio, hidrofóbicas, etc.) é polimerizado pelos procedimentos convencionais para produzir uma rede polimérica tri-dimensional contendo cavidades (sítios) presumivelmente complementares, tanto em forma como em função, da molécula impressa.

Polímeros de moléculas impressas (PMI) podem ser aplicados na separação de substâncias racêmicas, polímeros ativos cataliticamente, análogos aos sítios de ligação do anticorpo (ou receptor), com implicações gerais em bioquímica analítica, particularmente na construção de sensores seletivos de analitos (substratos).

Vlatakis et al.²⁰¹, desenvolveram um procedimento analítico utilizando PMI para a determinação de teofilina e diazepam como uma alternativa aos anticorpos biológicos. Essas drogas foram usadas como moléculas impressas para preparar polímeros que imitassem os sítios combinantes desses anticorpos. Os PMI obtidos foram estáveis, sensíveis e de baixo custo.

Mais recentemente, Kris et al.²⁰² descreveram o uso dos PMI

Tabela 11. Estratégias empregadas na construção de moléculas impressas.**(A) impressão molecular de enzimas, proteínas não enzimáticas e outras macromoléculas****Características:**

- baseada na rigidez conformacional da proteína em meio anidro
- utiliza uma macromolécula pré-existente
- o ligante induz modificações na conformação da macromolécula
- meios com baixo conteúdo de água são necessários
- é um processo relativamente simples
- apresenta boa seletividade
- no caso de enzimas, uma notável intensificação desse processo é verificada em meio não aquoso

Proposta para:

- aumentar a velocidade da reação enzimática em meio não-aquoso (ou até alterar a especificidade do substrato)
- bioadsorventes
- separações cromatográficas

(Bio) Polímeros de moléculas impressas (covalente ou não-covalentemente)**Características:**

- polimerização ocorre na presença da espécie que se ligará ao polímero (esta espécie atuará como um molde, criando o espaço exato para interagir)
- tipicamente usado em solventes orgânicos (mas não necessariamente)
- boa seletividade
- excelente estabilidade
- maior versatilidade

Proposta para:

- bioadsorventes
- separações cromatográficas
- simulação de enzimas
- simulação de anticorpos
- preparação de biossensores

para gerar placas cromatográficas (camada fina) para a separação rápida de quirais de alguns derivados de aminoácidos e Sellergren²⁰³, registrou a utilização dessa técnica como etapa de enriquecimento seletivo na extração da pentamidina (droga de ação antiprotozoária) de fluidos biológicos.

Com o refinamento das técnicas para obtenção de moléculas impressas, uma aplicação adicional óbvia deve ser o uso de polímeros substratos-seletivos como componentes de sensores. Por substituição da parte biológica do sistema (enzimas ou anticorpo) por polímeros cataliticamente ativos ou ligantes específicos preparados a partir de moléculas impressas específicas, sistemas mais robustos serão obtidos. Trabalhos nessa área ainda são raros e poucos dados estão disponíveis no momento.

Andersson et al.²⁰⁴, usando medidas de potencial, diferenciaram isômeros ópticos de derivados de aminoácidos em uma coluna que continha moléculas impressas. Em outro estudo²⁰⁵, elipsometria foi empregada para o monitoramento da ligação específica da vitamina K₁ em uma superfície de silicone impressa.

Todos esse estudos são preliminares mas não há dúvida que em um futuro próximo muitos sensores utilizarão sistemas sintéticos contendo sítios de ligação com elevada afinidade e seletividade. Há também em curso o desenvolvimento de sistemas múltiplos similares ao já descrito "nariz artificial" (ou eletrônico, como preferem alguns autores) para a determinação de um ou vários compostos. Também é previsto o desenvolvimento de sistemas de "contato direto", onde "eletrodos moleculares" possam estar em íntimo contato com o transdutor para produzir uma resposta simultânea no momento da ligação²⁰⁰.

Os principais aspectos das estratégias empregadas na construção de moléculas impressas encontram-se resumidas na Tabela 11.

Atividade enzimática em fluidos supercríticos (FSC)

Fluidos supercríticos (FSC), são materiais acima de suas temperaturas críticas, condição em que não podem ser liqüefeitos. Acima do ponto crítico, a energia térmica molecular excede as forças atrativas entre as moléculas. Conseqüentemente, as propriedades dos FSC é uma ponte entre as propriedades dos gases e dos líquidos.

As densidades dos FSC são comparáveis àquelas dos líquidos enquanto que as viscosidades e os coeficientes de difusão são comparáveis àquelas dos gases (Tabela 12). Há pelo menos uma ordem de magnitude de diferença entre as viscosidades dos FSC

e líquidos e desta maneira, os coeficientes de difusão dos FSC são uma ordem de magnitude superior àqueles dos líquidos.

Tabela 12. Propriedades termofísicas dos fluidos supercríticos comparadas com gases e líquidos.

Propriedade	Líquido	Gases	FSC
Densidade (g/ml)	~1,0	~0,001	0,05 - 1,0
Viscosidade (cp)	~1,0	~0,01	0,05 - 0,15

Baixas viscosidades aumentam a velocidade de transferência de massa elevando assim, as velocidades de difusão. Os FSC possuem tensão superficial próxima de zero podendo, portanto penetrar em poros que são inacessíveis aos líquidos convencionais. O uso dos FSC como dispersante para biocatálise é relativamente novo. Os primeiros trabalhos concernentes apareceram em 1985²⁰⁶⁻²⁰⁸. Recentemente, o assunto tem sido revisado por Kamat et al.²⁰⁹.

Do ponto de vista tecnológico há algumas vantagens em se realizar reações catalisadas por enzimas em FSC a saber:

- a natureza hidrofóbica dos FSC permite a solubilização de espécies hidrofóbicas.
- não ocorre contaminação microbiana nos bioreatores de FSC porque as bactérias não crescem em meio não-aquoso.
- a baixa atividade de água do meio alterará o equilíbrio termodinâmico das reações hidrolíticas favorecendo a síntese.
- as temperaturas críticas e pressões de uma variedade de compostos estão no intervalo de 35 a 50°C e abaixo de 20 MPa, respectivamente.
- enzimas são insolúveis em FSC, sendo facilmente recuperadas, tornando sua imobilização desnecessária.
- reagentes gasosos tais como oxigênio e hidrogênio, são altamente miscíveis com FSC. Logo, as velocidades de reações envolvendo substratos gasosos não é limitada pela solubilidade.
- a solubilidade de um material em um FSC pode ser controlada pelo ajuste da pressão e por adição de pequenas quantidades de co-solventes tais como metanol e acetona.
- sem modificar o solvente, o fracionamento, a purificação e a cristalização do produto na mistura de reação são exequíveis, usando uma etapa de redução na pressão em uma seqüência de separadores.

Tabela 13. Exemplos de reações catalisadas por enzimas em fluidos supercríticos.

Enzima	Reação	Referência
<i>Polifenoloxidase</i>	Oxidação do <i>p</i> -cresol e <i>p</i> -clorofenol a <i>o</i> -benzoquinona	207
<i>Colesterol oxidase</i>	Oxidação do colesterol a 4-colesten-3-ona	214-215
<i>Subtilisina</i>	Transesterificação ^a	216
<i>Termolisina</i>	Oxidação de substratos precursores do aspartame	217
<i>Lipases de microrganismos</i>		
<i>Rhizopus delemar</i>	Interesterificação do ácido esteárico pela trioleína	218
<i>Mucor miehei</i>	a. Transesterificação do acetato de octil pelo geraniol b. Esterificação do ácido mirístico pelo etanol c. Esterificação do ácido oléico pelo etanol	219 220-222
<i>Candida cylindraceae</i>	a. Interesterificação do ácido esteárico pela trioleína b. Esterificação do ácido oléico pelo etanol	223-225 226

a. reação entre o éster cloro-etil-N-acetil-*l*-fenilalanina e etanol para produzir o éster etil-N-acetil-*l*-fenilalanina e cloroetanol.

Há inúmeros fatores que afetam a catálise enzimática em FSC, não cabendo aqui sua discussão. Dentre os parâmetros que a afetam, os mais importantes são: pressão, concentração de água, solvente, temperatura e os processos de transferência de massa.

Muitas enzimas são ativas e estáveis em FSC. As lipases, em particular, têm sido amplamente usadas para catalisar uma variedade de reações em dióxido de carbono supercrítico.

A utilização de outros FSC é também de grande interesse devido ao fato de que a velocidade de reação de muitas reações são mais lentas em dióxido de carbono supercrítico do que em outros fluidos (hexafluoreto de enxofre, etileno, etano, fluorofórmio).

Embora a biocatálise em FSC tenha sido estudada por mais de uma década, muitos fundamentos ainda permanecem obscuros. Por ex., a interação entre solvente-enzima ainda requer uma avaliação qualitativa e quantitativa; a influência da água sobre a atividade, estabilidade e especificidade não é ainda previsível. Este e muitos outros aspectos deverão ser investigados em futuro breve.

A partir do trabalho pioneiro de Randolph et al.²⁰⁶, onde ficou demonstrado o uso de um biocatalisador (a fosfatase alcalina), em FSC, objetivando hidrolisar o fosfato de *p*-nitrofenil dissódico, inúmeras aplicações industriais têm surgido, como alternativa para as operações de destilação e de extração de solvente²¹⁰⁻²¹³.

Na Tabela 13, lista-se algumas aplicações de enzimas que exibem atividade em FSC.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Transformações enzimáticas em meio orgânico já haviam sido registradas no início do século⁴⁰. Entretanto, até muito recentemente havia o consenso de que enzimas poderiam ser utilizadas apenas em meio aquoso e em temperaturas muito próximas da ambiente. Em meados da última década, os trabalhos desenvolvidos pelo grupo de Klíbanov^{10, 11, 41} e a seguir por diversos outros pesquisadores,^{9, 123} abriram novas fronteiras para o emprego da enzimologia em meios aquo-restritos, como por exemplo, a utilização de reações enzimáticas na transformação de espécies insolúveis em água, ou a possibilidade de trabalhar em condições de temperatura muito mais drásticas que as usuais em meio aquoso. Neste curto espaço de tempo, diversas aplicações surgiram, podendo ser destacada a síntese de numerosos produtos naturais, farmacêuticos, na área da química fina e de ingredientes alimentares.

Aplicações analíticas também tem se beneficiado das reações enzimáticas em meio orgânico. Biossensores amperométricos (contendo antígenos, enzimas purificadas, ou tecidos vegetais) tem sido empregados com sucesso em meio orgânico para a

resolução de problemas analíticos em áreas tão diversas como a clínica, na análise de alimentos e de amostras ambientais. Tais aplicações, ainda incipientes, deverão registrar um intenso crescimento nos próximos anos.

Nota. Já na etapa de revisão deste trabalho, tivemos acesso ao excelente artigo publicado em Química Nova²²⁷, que trata da imobilização de lipases em organo-géis, para a síntese de ésteres alifáticos em meio orgânico.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro do PADCT/CNPq (processo 62.0145/95.1). Os autores também agradecem à CAPES (A.W.O.L.) e ao CNPq (L.A.) pelas bolsas recebidas.

REFERÊNCIAS

1. Maugh II, T. H.; *Science* **1984**, 223, 154.
2. Arnold, F. H.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **1993**, 4, 450.
3. Arnold, F. H.; *Tibtech* **1990**, 8, 244.
4. Kennedy, J. F.; Cabral, J. M. S.; In *Biotechnology*; Rehm, H. J.; Reed, G.; Eds.; VCH; Weinheim 1987.
5. Katchalski-Katzir, E.; *Tibtech* **1993**, 11, 471.
6. Edwards, C.; *Microbiology of Extreme Environments*; McGraw-Hill; New York 1990.
7. Vieille, C.; Zeikus, J. G.; *Tibtech* **1996**, 14, 183.
8. Borgstrom, B.; Brockman, H. L.; *Lipases*; Elsevier; Amsterdam 1984.
9. Laane, C.; Tramper, J.; Lilly, M. D.; Eds.; *Biocatalysis in Organic Media*; Elsevier; Amsterdam 1987.
10. Zaks, A.; Klíbanov, A. M.; *Science* **1984**, 224, 1249.
11. Kazandjian, R. Z.; Klíbanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 5448.
12. Grunwald, J.; Wirz, B.; Scollar, M. P.; Klíbanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6732.
13. Kvittingen, L.; *Tetrahedron* **1994**, 50, 8253.
14. Kamat, S. V.; Iwaszkewycz, B.; Beckman, E. J.; Russell, A. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90, 2940.
15. Lamare, S.; Legoy, M. -D.; *Tibtech* **1993**, 11, 413.
16. Gill, I.; Vulfson, E.; *Tibtech* **1994**, 12, 118.
17. Langrand, G.; Secchi, M.; Buono, G.; Baratti, J.; Triantaphylides, C.; *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 1857.
18. Kirchner, G.; Scollar, M. P.; Klíbanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7072.
19. Oyama, K.; Nishimura, S.; Nunaka, Y.; Kihara, K.; Hashimoto, T.; *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 5242.
20. Macrae, A. R.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1983**, 60, 243A.
21. Saini, S.; Hall, M. F.; Downs, M. E. A.; Turner, A. P. F.;

- Anal. Chim. Acta* **1991**, 249, 1.
22. Braco, L.; *Mikrochim. Acta* **1995**, 120, 231.
 23. Willimann, H. -L.; Luisi, P. L.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 177, 897.
 24. Kuntz, I. D.; Kauzmann, W.; *Adv. Prot. Chem.* **1974**, 28, 239.
 25. Rupley, J. A.; Gratton, E.; Careri, G.; *Trends Biochem. Sci.* **1983**, 8, 18.
 26. Kazandjian, R. Z.; Dordick, J. S.; Klibanov, A. M.; *Biotechnol. Bioeng.* **1986**, 28, 417.
 27. Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 3194.
 28. Ross, N. W.; Schneider, H.; *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, 13, 370.
 29. Halling, P. J.; *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1040, 225.
 30. Halling, P. J.; *Trends Biotechnol.* **1989**, 7, 50.
 31. Valivety, R. H.; Halling, P. J.; Macrae, A. R.; *FEBS Lett.* **1992**, 301, 258.
 32. Valivety, R. H.; Halling, P. J.; Peilow, A. D.; Macrae, A. R.; *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1122, 143.
 33. Valivety, R. H.; Halling, P. J.; Macrae, A. R.; *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1118, 218.
 34. Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 8017.
 35. Wehtje, E.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B.; *Biocatalysis* **1993**, 7, 149.
 36. Volkin, D. B.; Staubli, A.; Langer, R.; Klibanov, A. M.; *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, 37, 843.
 37. Liu, W. R.; Langer, R. L.; Klibanov, A. M.; *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, 37, 177.
 38. Yang, Z.; Robb, D. A.; Halling, P. J. In *Biocatalysis in Non-conventional Media*; Tramper, J.; Vermue, M. H.; Beeftink, H. H.; von Stockar, V.; Eds.; Elsevier; Amsterdam 1992.
 39. Simonyan, M. A.; Naibandyan, R. M.; *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, 446, 432.
 40. Dastoli, F. R.; Price, S.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, 118, 163.
 41. Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, 82, 3192.
 42. Riva, S.; Chopineau, J.; Kieboom, A. P. G.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 584.
 43. Vasquez-Duhalt, R.; Fedorak, P. M.; Westlake, D. W. S.; *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, 45, 837.
 44. Hocknull, M. D.; Lilly, M. D. In *Biocatalysis in Organic Media*; Laane, C.; Tramper, J.; Lilly, M. D., Eds.; Elsevier; Amsterdam, 1987.
 45. Mozhaev, V. V.; Klmelnitsky, Y. L.; Sergeeva, M. V.; Belova, A. B.; Klyachko, N. L.; Levashov, A. V.; Martinek, K.; *Eur. J. Biochem.* **1989**, 184, 597.
 46. Klmelnitsky, Y. L.; Mozhaev, V. V.; Belova, A. B.; Sergeeva, M. V.; Martinek, K.; *Eur. J. Biochem.* **1991**, 198, 31.
 47. Belova, A. B.; Mozhaev, V. V.; Levashov, A. V.; Shergeeva, M. V.; Martinek, K.; Klmelnitsky, Y. L.; *Biokhim. (Eng.)* **1991**, 56, 1357.
 48. Kasche, V.; Michaelis, G.; Galunski, B.; *Biotechnol. Lett.* **1991**, 13, 75.
 49. Williams, A. C.; Woodley, J. M.; Ellis, P. A.; Lilly, M. D. In *Biocatalysis in Organic Media*; Laane, C.; Tramper, J.; Lilly, M. D., Eds.; Elsevier; Amsterdam 1987.
 50. Klmelnitsky, Y. L.; Levashov, A. Y.; Klyachko, N. M. L.; Martinek, K.; *Enzyme Microb. Technol.* **1988**, 10, 710.
 51. Gorman, L. A. S.; Dordick, J. S.; *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, 39, 392.
 52. Reichardt, C.; *Solvents Effects in Organic Chemistry*. Verlag Chemie; Weinheim 1979.
 53. Laane, C.; Boeren, S.; Hilhorst, R.; Veeger, C. In *Biocatalysis in Organic Media*; Laane, J.; Tramper, J.; Lilly, M. D., Eds.; Elsevier; Amsterdam 1987.
 54. Rekker, R. F.; de Kort, H. M.; *Eur. J. Med. Chim. Therapeutica* **1979**, 14, 479.
 55. Dunn III, W. J.; Koehler, M. G.; Grigoras, S.; *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 1121.
 56. Hansch, C.; Leo, A.; *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*. Wiley; New York 1979.
 57. Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D.; *Chem. Rev.* **1971**, 71, 525.
 58. Martinek, K.; Semenov, A. N.; Beresin, I. V.; *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, 658, 76.
 59. Duff, S. J. B.; Murray, W. D.; *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, 34, 153.
 60. Burton, S. G.; Duncan, J. R.; Kaye, P. T.; Rose, P. D.; *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, 42, 938.
 61. Cantarella, M.; Cantarella, L.; Alfani, F.; *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, 13, 547.
 62. Bonneau, P. R.; Eyer, M.; Graycar, T. P.; Stell, D. A.; Jones, J. B.; *Bioorg. Chem.* **1993**, 21, 431.
 63. Reslow, M.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1987**, 26, 1.
 64. Valivety, R. H.; Johnston, G. A.; Suckling, C. J.; Halling, P. J.; *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, 38, 1137.
 65. Wehtje, E.; *Parameters Influencing Enzyme Activity in Organic Media*. Doctoral Thesis, Lund University 1992.
 66. Yang, Z.; Robb, D. A.; *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, 43, 365.
 67. Guinn, R. M.; Skerker, P. S.; Kavanaugh, P.; Clark, D. S.; *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, 37, 303.
 68. Martins, J. F.; de Sampaio, T. C.; de Carvalho, I. B.; Barreiros, S.; *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, 44, 119.
 69. Schneider, L. V.; *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, 37, 627.
 70. Batra, R.; Gupta, M. N.; *Biotechnol. Lett.* **1994**, 16, 1059.
 71. Yennawar, H. P.; Yennawar, N. H.; Farber, G. K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 577.
 72. Blackwood, A. D.; Curran, L. J.; Moore, B. D.; Halling, P. J.; *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1206, 161.
 73. Russell, A. J.; Klibanov, A. M.; *J. Bio. Chem.* **1988**, 263, 11624.
 74. Stahl, M.; Mansson, M.-O.; Mosbach, K.; *Biotechnol. Lett.* **1990**, 12, 161.
 75. Stahl, M.; Jepsson-Wistrand, U.; Mansson, M.-O.; Mosbach, K. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9366.
 76. Yennawar, N. H.; Yennawar, H. P.; Farber, G. K.; *Biochemistry* **1994**, 33, 7326.
 77. Braco, L.; Dabulis, K.; Klibanov, A. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, 87, 274.
 78. Kauzmann; *Adv. Protein. Chem.* **1959**, 14, 1.
 79. Tanford, C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 4240.
 80. Tanford, C.; *Science* **1978**, 200, 1012.
 81. Dill, K. A.; *Biochemistry* **1990**, 29, 7133.
 82. Ahern, T.J.; Klibanov, A.M.; *Science* **1985**, 228, 1280.
 83. Zale, S. E.; Klibanov, A. M.; *Biochemistry* **1986**, 25, 5432.
 84. Volkin, D. B.; Klibanov, A. M. In *Protein Function, A Practical Approach*; Creighton, T.E.; Ed.; IRL Press; Oxford, 1989.
 85. Martinek, K.; Klibanov, A. M.; Gopldmacher, V. S.; Berezin, I. V.; *Biochim Biophys. Acta* **1977**, 485, 1.
 86. Ahern, T. J.; Klibanov, A. M.; In *Protein Structure, Folding and Design*; Oxender, D. L.; Ed.; Alan R. Liss; New York 1986.
 87. Garza-Ramos, G.; Darszon, A.; Tuena de Gomez-Puyou, M.; Gomez-Puyou, A.; *Biochemistry* **1989**, 28, 3177.
 88. Kaul, R.; Mattiasson, B.; *Biotechnol. Lett.* **1993**, 7, 585.
 89. Ottolina, G.; Carrea, G.; Riva, S.; Sartore, L.; Veronese, F. M.; *Biotechnol. Lett.* **1992**, 14, 947.
 90. Tsitsimpikou, C.; Voutou, D.; Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Macris, B. J.; Kolisis, F. N.; *Biotechnol. Lett.* **1994**, 16, 57.

91. Yang, Z.; Robb, D. A.; *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 1030.
92. Toscano, G.; Pirozzi, D.; Greco Jr.; G.; *Biotechnol. Lett.* **1990**, *12*, 821.
93. Ayala, G.; Tuena de Gomez-Puyou, M. T.; Gomez-Puyou, A.; Darszon, A.; *FEBS Lett.* **1986**, *203*, 41.
94. Klibanov, A. M.; *Chem. Tech.* **1986**, *16*, 354.
95. Klibanov, A. M. In *Biocatalysis in Organic Media*; Laane, C.; Tramper, J.; Lilly, M. D., Eds.; Elsevier; Amsterdam, 1987.
96. Dordick, J. S.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1988**, *19*, 103.
97. Tanaka, A.; Kawamoto, T. In *Protein immobilization: fundamentals and applications*; Taylor, R. F.; Ed.; Marcel Dekker; New York 1991.
98. Matos, J. R.; West, J. B.; Wong, C.H.; *Biotechnol. Lett.* **1987**, *9*, 233.
99. Margolin, A. L.; Tai, D. F.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7885.
100. Kitaguchi, H.; Tai, D. F.; Klibanov, A. M.; *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5487.
101. Margolin, A. L.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3802.
102. Reslow, M.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B.; *Eur. J. Biochem.* **1988**, *177*, 313.
103. Ooshima, H.; Mori, H.; Harano, Y.; *Biotechnol. Lett.* **1985**, *7*, 789.
104. Clapes, P.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B.; *J. Biotechnol.* **1990a**, *15*, 323.
105. Clapes, P.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B.; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1990b**, *12*, 376.
106. Kise, H.; Fugimoto, K.; *Biotechnol. Lett.* **1988**, *10*, 883.
107. Sears, P.; Schuster, M.; Wang, P.; Witte, K.; Wong, C.-H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6215.
108. Noritomi, H.; Kise, H.; *Biotechnol. Lett.* **1987**, *9*, 387.
109. Inada, Y.; Yoshimoto, T.; Matsushima, A.; Saito, Y.; *Trends Biotechnol.* **1986**, *4*, 68.
110. Cesti, P.; Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1985**, *11*, 401.
111. Therisod, M.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5638.
112. Kirchner, G.; Scollar, M. P.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072.
113. Effenberg, F.; Ziegler, T.; Forster, S.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 458.
114. Wang, Y. F.; Lalonde, J. J.; Momongan, M.; Bergbreiter, D. E.; Wong, C. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7200.
115. Yokeseki, K.; Yamanaka, S.; Takinaki, K.; Hirose, Y.; Tanaka, A.; Sanomoto, K.; Fukui, S.; *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1982**, *114*, 1.
116. Chopineau, J.; McCaffery, F. D.; Therisod, M.; Klibanov, A. M.; *Biotechnol. Bioeng.* **1988**, *31*, 208.
117. Wisdom, R. A.; Dunnill, P.; Lilly, M. D.; Macrae, A. R.; *Enzyme Microb. Technol.* **1984**, *6*, 443.
118. MaCrae, A. R. In *Biocatalysis in Organic Media*. Laane, C.; Tramper, J.; Lilly, M. D.; Eds.; Elsevier; Amsterdam, 1987.
119. Sakurai, T.; Margolin, A. L.; Russell, A. J.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7236.
120. Blain, J. A.; Akhtar, M. W.; Patterson, J. D.; *Pak. J. Biochem.* **1976**, *10*, 41.
121. Akhtar, M. W.; Nawazish, M. N.; Pasha, M.; Mirza, A.Q.; *Pak. J. Biochem.* **1980**, *13*, 56.
122. Kim, K. H.; Kwoon, D. Y.; Rhee, J. S.; *Lipids* **1984**, *19*, 975.
123. Boeriu, C. G.; Dordick, J. S.; Klibanov, A. M.; *BioTechnology* **1986**, *4*, 997.
124. Dordick, J. S.; Marletta, M. A.; Klibanov, A. M.; *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 31.
125. Hall, G. F.; Best, D. J.; Turner, A. P. F.; *Enzyme Microb. Technol.* **1988**, *10*, 543.
126. Hall, G. F.; Best, D. J.; Turner, A. P. F.; *Anal. Chim. Acta* **1988**, *213*, 113.
127. Díaz-García, M. E.; Valencia-González, M. J.; *Talanta* **1995**, *42*, 1763.
128. Connor, M. P.; Sanchez, J.; Wang, J.; Smyth, M. R.; Mannino, S.; *Analyst* **1989**, *114*, 1427.
129. Hall, G. F.; Turner, A. P. F.; In *Biosensor '90: First World Conference on Biosensors*; Elsevier; Oxford; 1990; p 331.
130. Schubert, F.; Saini, S.; Turner, A. P. F.; *Anal. Chim. Acta* **1991**, *245*, 133.
131. Dong, S.; Guo, Y.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3895.
132. Miyabayashi, A.; Reslow, M.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B.; *Anal. Chim. Acta* **1989**, *219*, 27.
133. Flygare, L.; Danielsson, B.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1989**, *542*, 485.
134. Danielsson, B.; Flygare, L.; *Anal. Lett.* **1989**, *22*, 1417.
135. Taylor, R. F.; Marenchic, I. G.; Spencer, R. H.; *Anal. Chim. Acta* **1991**, *249*, 67.
136. Barzana, E.; Klibanov, A. M.; Karel, M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1987**, *15*, 25.
137. Arnold, M. A.; Rechnitz, G. A. In *Biosensors: Fundamentals and Applications*; Turner, A. P. F.; Karube, I.; Wilson, G.S.; Eds.; Oxford; New York 1987; p 30.
138. Lima, A. W. O.; Nascimento, V. B.; Pedrotti, J. J.; Angnes, L.; *19ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG: SBQ, 1996. Resumos, EQ 54.*
139. Wang, J.; Wu, L. H.; Angnes, L.; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2993.
140. Wang, J.; Lin, L.; Chen, Q.; *Electroanalysis* **1993**, *5*, 23.
141. Adeyoju, O.; Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; *Talanta* **1994**, *41*, 1603.
142. Campanella, L.; Favero, G.; Sammartino, M.; Tommasetti, M.; *Talanta* **1994**, *41*, 1015.
143. Campanella, L.; Fortuney, A.; Sammartino, M.; Tommasetti, M.; *Talanta* **1994**, *41*, 1397.
144. Mannino, S.; Cosio, M. S.; Wang, J.; *Analyst* **1994**, *119*, 2001.
145. Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; *Analyst* **1994**, *119*, 265.
146. Wang, J.; Naser, H. S.; Kwon, H.S.; Cho, M.Y.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, *264*, 7.
147. Hall, G.; Turner, A.P.F.; *Anal. Lett.* **1992**, *24*, 1375.
148. Wang, J.; Lin, Y.; Eremenko, A. V.; Ghindilis, A. L.; Kurochkin, I. N.; *Anal. Lett.* **1993**, *26*, 197.
149. Stancik, L.; Macholán, L.; Scheller, F.; *Electroanalysis* **1995**, *7*, 649.
150. Wang, J. *Talanta* **1993**, *40*, 1905.
151. Wang, J.; Reviejo, A.J.; Mannino, S.; *Anal. Lett.* **1992**, *25*, 1399.
152. Wang, J.; Lin, Y.; Chen, L.; *Analyst* **1993**, *118*, 277.
153. Wang, J.; Reviejo, A. J.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 845.
154. Wang, J.; Dempsey, E.; Eremenko, A.; Smyth, M. R.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, *279*, 203.
155. Wang, J.; Freiha, B.; Naser, N.; Romero, E. G.; Wollenberg, U.; Oszoz, M.; Evans, O.; *Anal. Chim. Acta* **1991**, *254*, 81.
156. Braco, L.; Darós, J. A.; de la Guardia, M.; *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 129.
157. Valencia-Gonzalez, M. J.; Diaz-Garcia, M. E.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2726.
158. Zili, M.; Converti, A.; Lodi, A.; Del Borghi, M.; Ferraiolo, G.; *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *41*, 693.
159. Yagi, T.; Tsuda, M.; Mori, Y.; Inokuchi, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 2801.
160. Kimura, K.; Suzuki, A.; Inokuchi, H.; Yagi, T.; *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *567*, 96.
161. Barzana, E.; Karel, M.; Klibanov, A. M.; *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, *34*, 1178.
162. Barzana, E.; Klibanov, A. M.; Karel, M.; *Anal. Biochem. Biotechnol.* **1987**, *15*, 25.

163. Barzana, E.; Klibanov, A. M.; Karel, M.; *Anal. Biochem.* **1989**, *182*, 109.
164. Pulvin, S.; Legoy, M. D.; Lortie, R.; Pensa, M.; Thomas, D.; *Biotechnol. Lett.* **1986**, *8*, 783.
165. Pulvin, S.; Parvaresh, F.; Thomass, D.; Legoy, M. D.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1988**, *542*, 434.
166. Ross, N. W.; Schneider, H.; *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13*, 370.
167. Parvaresh, F.; Vic, G.; Thomas, D.; Legoy, M. D.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1990**, *613*, 303.
168. Parvaresh, F.; Robert, H.; Thomas, D.; Legoy, M. D.; *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *39*, 467.
169. Robert, H.; Lamare, S.; Parvaresh, F.; Legoy, M. D.; *Prog. Biotechnol.* **1992**, *8*, 85.
170. Hamstra, R. S.; Murriss, M. R.; Tramper, J.; *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *29*, 884.
171. Hou, C. T.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1984**, *19*, 1.
172. Uchiyama, H.; Oguri, K.; Yagi, O.; Kokufuta, E.; *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 619.
173. Duff, S. J. B.; Murray, W. D.; *Process Biochem.* **1990**, *25*, 40.
174. Cedenio, M.; Waissbluth, M.; In *Enzyme Engineering* (v.4); Broun, G. B.; Manecke, G.; Wingard, L. B. eds.; Plenum Press; London 1978.
175. Bauer, W.; Röttenbacher, L.; *Entropie* **1985**, *124*, 18.
176. Röttenbacher, L.; Schöbler, M.; Bauer, W.; *Bioprocess Eng.* **1987**, *2*, 25.
177. Bauer, W.; *Can. J. Chem. Eng.* **1986**, *64*, 561.
178. Guilbault, G. G.; *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 1682.
179. Guilbault, G. G.; Luong, J. H.; *J. Biotechnol.* **1988**, *9*, 1.
180. Ngeh-Ngwainbi, J.; Foley, P. H.; Kuan, S. S.; Guilbault, G. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5444.
181. Mitsubayashi, K.; Yokoyama, Takeuchi, T.; Karube, I.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3297.
182. Russell, A. J.; Trudel, L. J.; Skipper, P. L.; Groopman, J. D.; Tannenbaum, S. R.; Klibanov, A. M.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *158*, 80.
183. Kohler, G.; Milstein, C.; *Nature* **1975**, *256*, 495.
184. Seiler, F. R.; Gronski, P.; Kurrle, R.; Lüben, P.; Harthus, H.-P.; AX, W.; Bosslet, K.; Schwick, H.-G.; *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1985**, *24*, 139.
185. Schultz, P. G.; *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1989**, *10*, 1283.
186. Schultz, P. G.; *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 287.
187. Powell, M. J.; Hansen, D. E.; *Protein Eng.* **1989**, *3*, 69.
188. Suckling, C. J.; *Biochem. Soc. Trans.* **1992**, *20*, 216.
189. Janda, K. D.; Ashley, J. A.; Jones, T. M.; McLeod, D. A.; Schloeder, D. M.; Weinhouse, M. I.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8886.
190. Durfor, C. N.; Bolin, R. J.; Sugasawara, R. J.; Massey, D. M.; Jacobs, J. W.; Schultz, P. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8713.
191. Benkovic, J. S.; Adams, J. A.; Borders, C. I.; Janda, K. D.; Lerner, R. A.; *Science* **1990**, *250*, 1135.
192. Cram, D.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1009.
193. Lehn, J. M.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 89.
194. Pedersen, C. J.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1021.
195. Breslow, R. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*; Meister, A. Ed.; Wiley; New York, 1986.
196. Dabulis, K.; Klibanov, A. M.; *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *39*, 176.
197. Deetz, J. S.; Rozzell, J. D.; *Tibtech* **1988**, *6*, 15.
198. Frieden, C.; *Ann. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 471.
199. Mingarro, I.; Abad, A.; Braco, L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 3308.
200. Mosbach, K.; *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 9.
201. Vlatakis, G.; Andersson, L. I.; Müller, R.; Mosbach, K.; *Nature* **1993**, *361*, 645.
202. Kriz, D.; Kriz, C. B.; Andersson, L. I.; Mosbach, K.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2636.
203. Sellergren, B.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1578.
204. Andersson, L. I.; Miyabayashi, A.; O'shannessy, D. J.; Mosbach, K.; *J. Chromatogr.* **1990**, *516*, 323.
205. Hedborg, E.; *Sens. Actuators* **1993**, *A37-38*, 796.
206. Randolph, T. W.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M.; Wilke, C. R.; *Biotechnol. Lett.* **1985**, *7*, 325.
207. Hammond, D. A.; Karel, M.; Klibanov, A. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1985**, *11*, 393.
208. Nakamura, K.; Chi, Y. M.; Yamada, Y.; Yano, T.; *Chem. Eng. Commun.* **1985**, *45*, 207.
209. Kamat, S. V.; Beckman, E. J.; Russell, A. J.; *Crit. Rev. Biotechnol.* **1995**, *15*, 41.
210. Randolph, T. W.; *Tibtech* **1990**, *8*, 78.
211. Larson, K. A.; King, M. L.; *Biotechnol. Prog.* **1986**, *2*, 73.
212. Williams, D. F.; *Chem. Eng. Sci.* **1981**, *36*, 1769.
213. Wong, J. M.; Johnston, K. P.; *Biotechnol. Prog.* **1986**, *2*, 29.
214. Randolph, T. W.; Clark, D. S.; Blauch, H. W.; Prausnitz, J. M.; *Science* **1988**, *239*, 387.
215. Randolph, T. W.; Clark, D. S.; Blauch, H. W.; Prausnitz, J. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 2979.
216. Pasta, P.; Mazzola, G.; Carrea, G.; Riva, S.; *Biotechnol. Lett.* **1989**, *2*, 643.
217. Kamihira, M.; Taniguchi, M.; Kobayashi, T.; *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 3427.
218. Chi, Y. M.; Nakamura, K.; Yano, T.; *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 1541.
219. Chulalaksananukul, W.; Condoret, J. S.; Combes, D.; *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 691.
220. Dumont, T.; Barth, D.; Corbier, C.; Branlast, G.; Perrut, M.; *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *39*, 329.
221. Marty, A.; Chulalaksananukul, W.; Wilemot, R. M.; Condoret, J. S.; *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *39*, 273.
222. Marty, A.; Chulalaksananukul, W.; Wilemot, R. M.; Durand, G.; *Biotechnol. Lett.* **1990**, *12*, 11.
223. Ramat, S. V.; Beckman, E. J.; Russell, A. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8845.
224. Kamat, S.; Barrera, J.; Beckman, E. J.; Russel, A. J.; *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *40*, 158.
225. Kamat, S. V.; Iwaskewyz, B.; Beckman, E. J.; Russel, A. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 2940.
226. Yu, Z.; Rizvi, S. H.; Zollweg, J. A.; *Biotechnol. Prog.* **1992**, *8*, 508.
227. Jesus, P. C.; João, J. J.; Silva, P. L. F.; Burlin, G.; Nascimento, M. G.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 664.