

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Química
Doutorado em Química

Rômulo Augusto de Abreu Franchini

**IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO,
CATALASE E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA EM AMOSTRAS DE MEL**

Juiz de Fora
2010

Rômulo Augusto de Abreu Franchini

**IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO, CATALASE E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA EM AMOSTRAS DE MEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração: Química Analítica, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial de obtenção do grau de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Renato Camargo Matos

JUIZ DE FORA

2010

Franchini, Rômulo Augusto de Abreu.

Imobilização enzimática para a determinação de peróxido de hidrogênio, catalase e avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana em amostras de mel / Rômulo Augusto de Abreu Franchini. – 2010.

254 f. : il.

Tese (Doutorado em Química)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Enzimas. 2. Mel. 3. Peróxido de hidrogênio. 4. Catalase. I. Título.

CDU 577.15

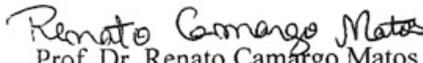


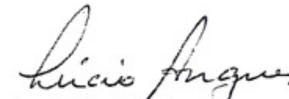
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

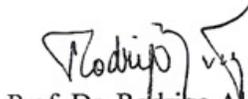
UFJF
Pós-Graduação
em Química

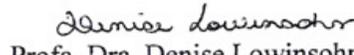
ATA DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO DA TESE DE DOUTORADO DO BACHAREL RÔMULO AUGUSTO DE ABREU FRANCHINI com fim de obtenção do grau de **Doutor em Química**. Às 13 horas do dia 04 de agosto de dois mil e dez na sala 3109 no Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora, reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores: **Prof. Dr. Renato Camargo Matos** (Orientador do Candidato e Presidente da Comissão), **Prof. Dr. Lúcio Angnes** (USP), **Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz** (UFU), **Profa. Dra. Denise Lowinsohn** (UFJF) e **Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa** (UFJF) para dar cumprimento ao Artigo 34 do Regimento Geral da Pós-Graduação da Universidade Federal de Juiz de Fora, submetendo o bacharel Rômulo Augusto de Abreu Franchini à arguição do seu trabalho de tese de Doutorado, que recebeu o título de **“Imobilização Enzimática para a Determinação de Peróxido de Hidrogênio, Catalase e Avaliação *In Vitro* da Atividade Antibacteriana em Amostras de Mel”**. Às 13 horas do mesmo dia o candidato fez uma exposição oral de seu trabalho durante aproximadamente 40 minutos e, após esta, procederam à sua arguição e apresentaram seus pareceres individuais sobre o trabalho e o parecer final da comissão, concluindo pela aprovação do trabalho.

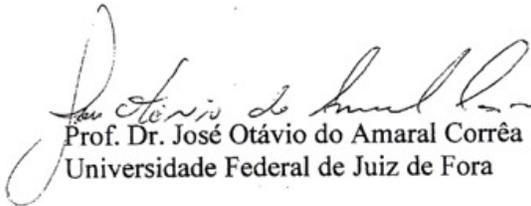
Juiz de Fora, 04 de agosto de 2010.


Prof. Dr. Renato Camargo Matos
Universidade Federal de Juiz de Fora


Prof. Dr. Lúcio Angnes
Universidade de São Paulo


Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz
Universidade Federal de Uberlândia


Profa. Dra. Denise Lowinsohn
Universidade Federal de Juiz de Fora


Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa
Universidade Federal de Juiz de Fora

Campus Universitário, Bairro Martelos, 36.036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil
Tel/Fax: (032) 2102-3310

EMOL: R\$ 2,78
RECOMP.: R\$ 0,17
T.JUD.: R\$ 0,92

AUTENTICAÇÃO
Notário do 1.º Ofício
MARIANO FARIA
CONFERE COMO ORIGINAL
APRESENTADO DO RE

JUIZ DE FORA
27 AGO 2010
Esp. Teor. da Verdade
Gel. Pto X.70 Juiz de Fora-MG
Notário MARIANO FARIA
VANESSA AREILA BASTOS
Escrivã Autorizada U



Seta de Fiscal
AUTENT
BJH 3

*Aos meus pais,
Milton e Lucy Franchini,
pelo amor, carinho, apoio e compreensão
em todos os momentos de minha vida.*

*Ao mestre e amigo; pela confiança, ensinamento e estímulo
depositados em mim ao longo desses
anos de pesquisa, Professor Renato Camargo Matos.*

*Em especial, a Odenir Cardoso Moreira,
Ângela Miller e toda família “A Original” pela oportunidade.*

*À minha querida Mônica Aziz El-Corab
pelo eterno apoio, amor e paciência.*

*Aos Professores Cláudio Diniz e Vânia Silva;
Andréa Ponzó, Lucas Rocha e Diego Henriques
pelo auxílio nas realizações das análises
microbiológicas e palinológicas no decorrer
da pesquisa.*

*À Deus e a uma das suas criações
mais fantásticas: as abelhas.*

AGRADECIMENTOS

Aos mestres Luiz Fernando, Mauro, Rosana Colombara, Maria Auxiliadora, Flávia Cavaleiri, Cherrine Kelce e demais professores do Departamento de Química pela oportunidade do engrandecimento contínuo do conhecimento ao longo dos anos;

Aos amigos de laboratório e companheiros de pesquisa: Rafael “danadão”, Felipo, Cabrini, Diego, Kellington, Pollyana, Luis, Lippy, Harley, Marcos, Fernando, Rogério Chinelato (mestre), Melina, Michele e a todos os outros pela ajuda, paciência e compreensão;

Aos professores, companheiros e amigos da UNIPAC: Zé Otávio, Harleson, Giu, Carina Bastos e Edilene pelo apoio e ajuda nessa longa caminhada de pesquisa;

Aos professores do curso de farmácia da UNIFESO e em especial ao coordenador professor Valter pela compreensão durante a correria dos dias que ministro aula em Teresópolis;

Aos comandados de Andrade pelos momentos singulares de apreensão e felicidade proporcionado pelo Flamengo pela conquista do hexacampeonato brasileiro de futebol;

À Simone e Masahiro Hozumi, além do Fillipe Mendonça por disponibilizar as amostras estrangeiras de mel. A todos meus alunos, da UNIPAC e UNIFESO, pela troca de experiências e estímulo nesses anos de docência;

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho e a possibilidade da conclusão deste trabalho;

Ao Departamento de Química e seu programa de Pós-Graduação, à Universidade Federal de Juiz de Fora/Propesq, CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio logístico e financeiro, sem os quais este trabalho ficaria inviável.

*“Hay hombres que luchan un día y son buenos.
Hay otros que luchan un año y son mejores.
Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos.
Pero hay los que luchan toda la vida:
esos son los imprescindibles”*

Bertolt Brecht

RESUMO

O mel é uma mistura complexa constituída de carboidratos, enzimas, aminoácidos, minerais, ácidos orgânicos e flavonóides. Inúmeros trabalhos evidenciam o potencial terapêutico do mel, o qual suas principais propriedades são a atividade antimicrobiana e ação cicatrizante, sendo estas atribuídas a fatores como acidez, osmolaridade, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), catalase e flavonóides. A primeira pesquisa deste trabalho consistiu na determinação da origem floral das amostras de mel, realizada através da análise microscópica do pólen (melissopalínologia). Os espectros demonstraram a variabilidade polínica das amostras escolhidas. Em outro estudo, dois métodos versáteis, envolvendo a espectrofotometria e amperometria, foi aplicado na determinação dos teores de H_2O_2 em 17 amostras de mel. O H_2O_2 foi determinado por análise de injeção em fluxo (FIA) e reatores tubulares contendo a enzima peroxidase imobilizada na resina Amberlite IRA-743. A determinação espectrofotométrica baseou-se na oxidação do H_2O_2 pela enzima na presença de fenol e 4-aminoantipirina e o complexo anti-pirilquinonimina gerado, foi proporcional a concentração de H_2O_2 . Na determinação amperométrica, um eletrodo de ouro eletrodepositado com platina, eletrodo de $Ag/AgCl_{(sat)}$ (+ 0,60V) e uma agulha de aço inoxidável foram utilizados como eletrodos de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente. O método baseou-se em três medidas no sistema FIA e a diferença entre os sinais revelou a corrente proporcional de H_2O_2 no mel. Ambos os métodos apresentaram ampla faixa de linearidade (0,5 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e baixos limites de quantificação e detecção. As concentrações encontradas ficaram entre 4 e 214 $\mu\text{g g}^{-1}$. A determinação de H_2O_2 provou a rapidez, exatidão e sensibilidade dos métodos quando associados aos sistemas FIA. Em outro trabalho, um sensor amperométrico para a determinação da catalase (CAT), acoplado ao sistema FIA e reatores tubulares foi desenvolvido. A quantificação fundamentou-se em 2 etapas de injeção: (1) padrão de H_2O_2 e (2) padrão de H_2O_2 tratado com a CAT imobilizada na Amberlite IRA-743. A diferença da corrente entre (1) e (2) mostrou o consumo de H_2O_2 por unidade de enzima imobilizada. O mesmo procedimento foi aplicado para as amostras de mel e a linearidade da curva para a determinação da CAT ficou entre 100 e 5000 UI mL^{-1} . Os níveis de CAT variaram

de 9 a 99 UI mg⁻¹. Os resultados demonstraram uma boa relação inversa entre os teores de CAT e H₂O₂. O último estudo avaliou, *in vitro*, a atividade antibacteriana contra 18 linhagens de bactérias Gram positivas e negativas. O *screening* antimicrobiano foi determinado aplicando testes de difusão em ágar e diluição em caldo, exibindo as concentrações inibitórias mínimas, conforme recomendações da CLSI. Concentrações de mel variando entre 1 e 30% (v/v) foram estudadas e 5 amostras apresentaram atividade bacteriostática, especialmente contra *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Os resultados reforçaram a idéia da utilização do mel como agente antimicrobiano e enfatizaram que o H₂O₂ não é o único inibidor de crescimento bacteriano, mas sim um dos constituintes com atividade bacteriostática e bactericida.

Palavras Chave: Mel, Peróxido de Hidrogênio, Enzima Imobilizada, Catalase, Atividade Antibacteriana.

ABSTRACT

Honey is a complex mixture of carbohydrates, amino acids, minerals, organic acids and flavonoids. The therapeutic potential of honey is gradually growing and its scientific evidences of effectiveness. Honey has been reported as antimicrobial agent, to promote healing wound and burns and the antibacterial activity is attributed to factors such as acidity, osmolarity, hydrogen peroxide (H_2O_2), catalase and flavonoids. The first research of this work involved the determination of the floral origin of honey which was achieved by microscopic analysis of the pollen (melissopalynology). The pollen spectrum showed the pollinic variety corresponding to different taxonomic levels. In the other study, two versatile methods involving spectrophotometry and amperometry were applied for the determination of H_2O_2 in 17 commercial honey samples. H_2O_2 was determined by flow-injection analysis (FIA) with a tubular reactor containing peroxidase enzyme immobilized on Amberlite IRA-743 resin. The spectrophotometric determination was based on the oxidation of H_2O_2 by the enzyme in presence of phenol and 4-aminoantipirine. The rate of color generation, due to the formation of the antipyrilquinonimine species was proportional to the concentration of H_2O_2 . In the amperometric determination, a gold electrode modified by electrochemical deposition of platinum, an $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ electrode (+ 0.60V) and a stainless steel tube were employed as working, reference and auxiliary electrodes, respectively. This method was based on three measurements in the FIA system and the difference between peaks showed the proportional current of H_2O_2 in the honey samples. Both methods showed wide linear dynamic range for H_2O_2 (0.5 to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and low quantification/detection limits. The concentrations found in the analyzed honeys samples were in the range of 4-214 $\mu\text{g g}^{-1}$ of H_2O_2 . The determination of H_2O_2 showed the rapidness, accuracy and sensitivity provided by the two methods, while combined with the FIA system. An amperometric sensor for catalase (CAT) detection in association with FIA system and a tubular reactor containing Amberlite IRA-743 was developed. Catalase quantification was based on two injections: (1) H_2O_2 standard solution and (2) H_2O_2 standard solution treated with CAT immobilized on Amberlite IRA-743. The difference between the current obtained from (1) and (2) showed the consumption of H_2O_2 per unit of enzyme immobilized. The same

procedure was used to immobilize CAT in honey samples. The linear dynamic range for CAT extends from 100 to 5000 UI mL⁻¹. The levels of CAT vary from 9 to 99 UI mg⁻¹. Taking into account these results, an inverse correlation was obtained between CAT and H₂O₂ levels. Finally the antibacterial evaluation of honeys samples against 18 bacterial strains including Gram-negative/positive species was studied. The screening of antimicrobial potential was determined using the drop-test agar diffusion and the broth dilution methods according to the CLSI recommendations. Increasing honey concentrations, varying from 1 to 30% (v/v) were studied and five samples demonstrated bacteriostatic activity against ATCC[®] *S. aureus*, *S. epidermidis* and *E. coli* bacterial strains. The results of this preliminary study tend to reinforce the use of honey as antimicrobial agent and emphasize that H₂O₂ is not the only inhibine present in honey, but it is one of the whole group with bacteriostatic and bactericidal activity.

Key Words: Honey, Hydrogen Peroxide, Immobilized Enzyme, Catalase, Antibacterial Activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Espécies de abelhas encontradas no Brasil: (A) <i>Apis mellifera</i> (abelha africana), (B) <i>Melipona quadrifasciata</i> (mandaçaia), (C) <i>Tetragonisca angustula</i> (abelha jataí ou mosquitinho) e (D) <i>Trigona sp.</i> (irapuã ou abelha cachorro).	33
Figura 2: Grãos de pólen de (A) <i>Eucalyptus spp.</i> e (B) <i>Citrus spp.</i>	34
Figura 3: Quebra das ligações α -1,4 do amido, pela enzima diastase (α -amilase), em resíduos de glicose.	39
Figura 4: Quebra da sacarose (dextrorrotatória) em glicose e frutose (levorrotatória) pela enzima invertase.	41
Figura 5: Ações enzimáticas da glicose oxidase e catalase.	41
Figura 6: Flor de Manuka (<i>Leptospermum scoparium</i> : Myrtaceae).	45
Figura 7: Ferida em paciente, portador de leucemia mielóide aguda, submetido a toracotomia com infecção pós-cirúrgica local. Preparação farmacêutica a base de mel foi aplicada em curativo com alginato de cálcio. Cicatrização da ferida em 24 horas.	52
Figura 8: Reconhecimento complexo enzima-substrato.	58
Figura 9: Métodos de imobilização de enzimas.	64
Figura 10: Reação de suportes aminopropilados para imobilização covalente, usando glutaraldeído como agente de ativação.	66
Figura 11: Origem geográfica das amostras de mel utilizadas na pesquisa.	77
Figura 12: Fotomicrografia dos grãos de pólen encontrados na análise palinológica das 17 amostras de mel (aumento de 400 a 1000x). (1) <i>Leptospermum</i> , (2) <i>Citrus</i> , (3) <i>Astragalus</i> , (4) <i>Croton</i> , (5) <i>Mimosa</i> , (6) <i>Serjania</i> , (7) <i>Eucalyptus</i> e (8) Lâmina típica de uma amostra Multuifloral ou Silvestre.	83
Figura 13: Espectrofotômetro Shimadzu® UV 1601 PC.	88
Figura 14: Diagrama esquemático para a imobilização da peroxidase sobre a resina de troca iônica. IRA: Amberlite IRA-743, GLU: glutaraldeído e POD: peroxidase.	90
Figura 15: Reator tubular com a enzima peroxidase imobilizada.	91
Figura 16: Processo químico de formação das ligações covalentes durante a imobilização Amberlite IRA-743 – GLU – POD.	91

Figura 17: Estrutura poliestirênica e grupo funcional metilglucamina da resina aniônica Amberlite IRA-743.	92
Figura 18: Mini-compressor tipo “bomba de aquário” utilizado para propelir as soluções e reagentes durante a análise em fluxo.	93
Figura 19: Injetor comutador utilizado no sistema FIA para a determinação espectrofotométrica de H ₂ O ₂ nas amostras de mel.	94
Figura 20: Diagrama esquemático do sistema FIA empregado para a análise de peróxido de hidrogênio. A: amostra, B: bomba de aquário, E eletrólito (solução tampão fosfato pH 7,4), V: válvula de controle do fluxo, L: <i>loop</i> ou alça de amostragem, POD: enzima peroxidase imobilizada em reator tubular, M: microcomputador e D: descarte. Na determinação espectrofotométrica a reação se processa num balão volumétrico (BV) entre 5-10' para posterior leitura no espectrofotômetro (Spe) λ_{\max} 510 nm.	94
Figura 21: Mecanismo de Chance-George.	95
Figura 22: Mecanismo de formação da anti-pirilquinonimina.	96
Figura 23: Exemplo de espectro de absorção do complexo anti-pirilquinonimina gerado na determinação de H ₂ O ₂ .	96
Figura 24: Reação global da formação da anti-pirilquinonimina.	97
Figura 25: Estudo da influência da concentração de fenol nas medidas espectrofotométricas. Dados: [H ₂ O ₂] _{final} = 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [4-Aminoantipirina] _{final} = 0,3 mmol L ⁻¹ e solução tampão fosfato pH 7,4.	99
Figura 26: Estudo da influência da concentração de 4-Aminoantipirina nas medidas espectrofotométricas. Dados: [H ₂ O ₂] _{final} = 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [Fenol] _{final} = 1,27 mmol L ⁻¹ e solução tampão fosfato pH 7,4.	99
Figura 27: Estudo da influência da concentração de peroxidase nas medidas espectrofotométricas. Dados: [H ₂ O ₂] _{final} = 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [Fenol] _{final} = 1,27 mmol L ⁻¹ , [4-Aminoantipirina] _{final} = 0,3 mmol L ⁻¹ e solução tampão fosfato pH 7,4.	100
Figura 28: Estudo da imobilização enzimática em diferentes tipos de resinas nas medidas espectrofotométricas. Dados: [H ₂ O ₂] _{final} = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [Fenol] _{final} = 1,27 mmol L ⁻¹ , [4-Aminoantipirina] _{final} = 0,3 mmol L ⁻¹ e solução tampão fosfato pH 7,4.	102
Figura 29: Estudo da estabilidade do reator imobilizado com a enzima peroxidase em 30 medidas. Dados: [H ₂ O ₂] _{final} = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [Fenol] _{final} = 1,27 mmol L ⁻¹ , [4-Aminoantipirina] _{final} = 0,3 mmol L ⁻¹ e solução tampão fosfato pH 7,4.	103

- Figura 30: Estudo da estabilidade do reator imobilizado com a enzima peroxidase em 30 medidas. Dados: $[H_2O_2]_{final} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[Fenol]_{final} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[4\text{-Aminoantipirina}]_{final} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4. 104
- Figura 31: Estabilidade do reator imobilizado frente à estocagem à -20°C e sua posterior reutilização, em semanas. Dados: $[H_2O_2]_{final} = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[Fenol]_{final} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[4\text{-Aminoantipirina}]_{final} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4. 105
- Figura 32: Protocolo de estocagem dos reatores tubulares enzimáticos – PEROXIDASE. 106
- Figura 33: Teste de reutilização da resina Amberlite IRA-743 com nova imobilização enzimática da peroxidase, após lavagem e secagem do suporte em estufa por 100°C . Dados: $[H_2O_2]_{final} = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[Fenol]_{final} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[4\text{-Aminoantipirina}]_{final} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4. 109
- Figura 34: Vinte reutilizações da resina Amberlite IRA-743 para imobilização da enzima peroxidase. Dados: $[H_2O_2]_{final} = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[Fenol]_{final} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[4\text{-Aminoantipirina}]_{final} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4. 109
- Figura 35: Protocolo de reutilização de resinas ou suportes. 110
- Figura 36: Estudo da imobilização da peroxidase com a resina Amberlite IRA-743 - GLU em 30 minutos e 24 horas. Dados: $[H_2O_2]_{final} = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[Fenol]_{final} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[4\text{-Aminoantipirina}]_{final} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4. 113
- Figura 37: Estudo da influência da temperatura na estabilidade da enzima peroxidase. Dados: $[H_2O_2]_{final} = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[Fenol]_{final} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[4\text{-Aminoantipirina}]_{final} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4. 114
- Figura 38: Estudo de possíveis interferentes (glicose e frutose) na formação do complexo colorido anti-pirilquinonimina. Dados: $[H_2O_2]_{final} = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[Glicose]_{final} = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[Frutose]_{final} = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $[Fenol]_{final} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[4\text{-Aminoantipirina}]_{final} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4. 115
- Figura 39: Efeito do tempo de diluição na geração do H_2O_2 e formação do complexo colorido anti-pirilquinonimina. Dados: (A), solução tampão fosfato e (B), H_2O deionizada; amostras de mel, 10% (m/v): Manuka +5, Silvestre e Eucalipto Teresópolis; $[Fenol]_{final} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[4\text{-Aminoantipirina}]_{final} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$. 117
- Figura 40: Efeito do tempo de diluição na geração do H_2O_2 e formação do complexo colorido anti-pirilquinonimina. Dados: (A), solução tampão fosfato e 117

(B), H₂O deionizada; amostras de mel, 20% (m/v): Manuka +5, Silvestre e Eucalipto Teresópolis; [Fenol]_{final} = 1,27 mmol L⁻¹, [4-Aminoantipirina]_{final} = 0,3 mmol L⁻¹.

Figura 41: Curva analítica para determinação espectrofotométrica de H₂O₂ com concentrações variando de (A) 1,0 a 10 µmol L⁻¹ e (B) 10 a 100 µmol L⁻¹. 119

Figura 42: Curva analítica e espectro de absorção para determinação espectrofotométrica de H₂O₂ com concentrações variando de 1,0 a 100 µmol L⁻¹. 120

Figura 43: Esquema de diluição das amostras de mel e adição de padrões. 122

Figura 44: Curvas de calibração de adição-padrão para as amostras de mel (A) Manuka +5, (B) Morrão de Candeia e (C) Silvestre Teresópolis. 124

Figura 45: Potenciostato/galvanostato µAUTOLAB type III. 133

Figura 46: (A) Eletrodo de trabalho de ouro antes e após eletrodeposição de platina em sua superfície, (B) eletrodo de referência (Ag/AgCl_(sat)) e (C) eletrodos auxiliares ou contra-eletrodos (platina e agulha de aço inoxidável). 134

Figura 47: Célula (*wall-jet*) eletroquímica para a eletrodeposição da platina. 134

Figura 48: Célula eletroquímica para a determinação amperométrica do H₂O₂. 135

Figura 49: Instrumentação utilizada na determinação amperométrica diferencial do H₂O₂ em amostras de mel. 135

Figura 50: Diagrama esquemático do sistema FIA empregado para determinação de peróxido de hidrogênio. A: amostra, B: bomba de aquário, E: eletrólito (solução tampão fosfato pH 7,4), V: válvula de controle do fluxo, L: *loop* ou alça de amostragem, POD: enzima peroxidase imobilizada em reator tubular, C: célula eletroanalítica, Pstat: potenciostato/galvanostato, M: microcomputador e D: descarte. Na primeira etapa (1) da determinação amperométrica diferencial a amostra ou padrão são injetados sem passar pelo reator tubular. Já na segunda etapa (2) a amostra passa pela peroxidase imobilizada. 136

Figura 51: Modelo de funcionamento de um eletrodo com superfície modificada. Neste caso a redução da espécie oxidada O₂ a R₂ fica inibida pelo modificador. 138

Figura 52: Registros amperométricos do volume de injeção para concentrações de H₂O₂ a 10 µmol L⁻¹. Dados: Vazão 1,5 mL min⁻¹, percurso analítico 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado + 0,60 V vs. Ag/AgCl_(sat). 142

Figura 53: Variação da corrente de oxidação para $\text{H}_2\text{O}_2 = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em função do volume da amostra injetada no sistema FIA. Dados: Vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, percurso analítico 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. 142

Figura 54: Estudo da vazão no sistema amperométrico para determinação de H_2O_2 . Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, percurso analítico 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. 144

Figura 55: Estudo da vazão e registro amperométrico no sistema em fluxo na presença do reator enzimático. Dados: vazão $3,0 \text{ mL min}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (A): passagem do H_2O_2 sem o reator tubular com POD imobilizada, (B) passagem do H_2O_2 pelo reator tubular com POD imobilizada, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, percurso analítico 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. 146

Figura 56: Estudo da vazão e registro amperométrico no sistema em fluxo na presença do reator enzimático. Dados: vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (A): passagem do H_2O_2 sem o reator tubular com POD imobilizada, (B) passagem do H_2O_2 pelo reator tubular com POD imobilizada, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, percurso analítico 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. 147

Figura 57: Estudo da manutenção da atividade enzimática em diferentes concentrações de H_2O_2 . Dados: vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, percurso analítico 53 cm, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. Em destaque (círculos azuis) as maiores e menores porcentagens de consumo para as referentes concentrações de $1,0$ - $2,0$ e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 , respectivamente. 148

Figura 58: Estudo da manutenção da atividade enzimática em diferentes vazões submetidas no sistema FIA. Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, percurso analítico 53 cm, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. 149

Figura 59: Avaliação dos registros amperométricos em função do comprimento do percurso analítico. Dados: vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção $200 \mu\text{L}$; solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. 150

Figura 60: Seqüência de injeções sucessivas no sistema em fluxo: (I) mel Manuka +5, 10% (m/v) + padrões de H_2O_2 a $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; (II) mel Manuka +5, 10% (m/v), (III) mel Manuka +5, 10% (m/v). (A) sistema FIA sem reator enzimático e (B) sistema FIA com reator enzimático. Dados: vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, percurso analítico 53 cm, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. 152

- Figura 61: Seqüência de injeções sucessivas no sistema em fluxo. Da esquerda pra direita: Manuka +5, 10%, 5% e 2% (m/v). (I) mel + padrões de H₂O₂ a 2,0 µmol L⁻¹, (II) mel, (III) mel Manuka +5. (A) sistema FIA sem reator enzimático e (B) sistema FIA com reator enzimático. Dados: vazão 1,5 mL min⁻¹, percurso analítico 53 cm, volume de injeção 200 µL, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado +0,60 V vs. Ag/AgCl_(sat). 152
- Figura 62: Injeções repetitivas de padrões de H₂O₂ contendo: (A) 0,5, (B) 1,0, (C) 2,0, (D) 4,0, (E) 6,0, (F) 8,0 e (G) 10 µmol L⁻¹. Dados: vazão 1,5 mL min⁻¹, percurso analítico 53 cm, volume de injeção 200 µL, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado +0,60 V vs. Ag/AgCl_(sat). 154
- Figura 63: Curva analítica para determinação amperométrica de H₂O₂ com concentrações variando entre 0,5 e 10 µmol L⁻¹. 154
- Figura 64: Determinação amperométrica diferencial do H₂O₂ nas amostras de mel. 156
- Figura 65: Comparação dos resultados obtidos entre a técnica espectrofotométrica e a amperométrica diferencial para a determinação do H₂O₂ em amostras de mel. 161
- Figura 66: Distribuição dos teores de H₂O₂ (µg g⁻¹) em torno do valor médio para as duas técnicas utilizadas na pesquisa. 163
- Figura 67: Bomba peristáltica utilizada para propelir as soluções e reagentes durante a análise em fluxo para a determinação da catalase. Em destaque, ao lado direito, o diagrama mostrando o rotor e o canal de uma bomba peristáltica. 167
- Figura 68: Diagrama esquemático para a imobilização da catalase sobre a resina de troca iônica. IRA: Amberlite IRA-743, GLU: glutaraldeído e CAT: catalase. 169
- Figura 69: Reatores tubulares com a enzima catalase imobilizada. 169
- Figura 70: Processo químico de formação das ligações covalentes durante a imobilização Amberlite IRA-743 – GLU – CAT. 170
- Figura 71: Diagrama esquemático do sistema FIA empregado para o registro da corrente de oxidação do peróxido de hidrogênio. A: amostra, P: bomba peristáltica, E: eletrólito (solução tampão fosfato pH 7,4), L: *loop* ou alça de amostragem, CAT: enzima catalase imobilizada em reator tubular, C: célula eletroanalítica, Pstat: potenciostato/galvanostato, M: microcomputador e D: descarte. Na primeira etapa (1) da determinação amperométrica, padrão de H₂O₂ é injetado sem passar pelo reator tubular. Já na segunda etapa (2) o mesmo padrão passa pela catalase imobilizada. O decréscimo do sinal de oxidação do H₂O₂ é diretamente proporcional à quantidade de catalase 171

imobilizada no reator tubular.

Figura 72: Cálculos para a determinação amperométrica diferencial da catalase nas amostras de mel em função do consumo do H_2O_2 pela enzima imobilizada. 173

Figura 73: Comparativo da atividade enzimática, para o consumo de um padrão de H_2O_2 , da enzima catalase imobilizada nas resinas Amberlite IRA-120, IRA-400 e IRA-743. Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção 200 μL , vazão 1,5 mL min^{-1} , caminho percorrido 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado + 0,60 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. 175

Figura 74: Imobilização da catalase em três resinas diferentes: Amberlite IRA-120; Amberlite IRA-400, Amberlite IRA-743 e sem a presença do reator enzimático. Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção 200 μL , vazão 1,5 mL min^{-1} , caminho percorrido 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado + 0,60 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. 176

Figura 75: Estudo da estabilidade do reator Imobilizado frente a sucessivas injeções de H_2O_2 . Dados: 30 injeções sistema FIA; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção 200 μL , vazão 1,5 mL min^{-1} , caminho percorrido 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado + 0,60 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. 177

Figura 76: Estudo da estabilidade do reator Imobilizado frente a sucessivas injeções de H_2O_2 . Dados: 30 injeções sistema FIA; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção 200 μL , vazão 1,5 mL min^{-1} , caminho percorrido 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado + 0,60 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. 178

Figura 77: Estabilidade do reator imobilizado frente estocagem à - 20°C e sua posterior reutilização, em semanas. Dados: 30 injeções semana⁻¹; (A) $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção 200 μL , vazão 1,5 mL min^{-1} , caminho percorrido 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado + 0,60 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. 179

Figura 78: Protocolo de estocagem dos reatores tubulares enzimáticos – CATALASE. 180

Figura 79: Teste de reutilização da resina Amberlite IRA-743 com nova imobilização enzimática da catalase, após lavagem e secagem do suporte em estufa por 100° C. Dados: (A) Imobilização em resina nova e (B) Imobilização em resina reutilizada; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção 200 μL , vazão 1,5 mL min^{-1} , caminho percorrido 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado + 0,60 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. 183

Figura 80: Vinte reutilizações da resina Amberlite IRA-743 para imobilização da enzima catalase. Dados: 30 injeções análise⁻¹; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10$ e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção 200 μL , vazão 1,5 mL min^{-1} , caminho percorrido 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado + 0,60 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. 185

Figura 81: Protocolo de reutilização de resinas ou suportes.	186
Figura 82: Estudo da influência da temperatura no sistema enzimático e no consumo de H_2O_2 pela catalase. Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, caminho percorrido 53 cm , solução tampão fosfato pH $7,4$ e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.	190
Figura 83: Registros amperométricos para as injeções sucessivas de H_2O_2 no sistema FIA contendo padrões de catalase imobilizada em reator tubular: (A) 0, (B) 100, (C) 600, (D) 1000, (E) 2000, (F) 3000, (G) 4000 e (H) 5000 UI mL^{-1} . Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, percurso analítico 53 cm , volume de injeção $200 \mu\text{L}$, solução tampão fosfato pH $7,4$ e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.	193
Figura 84: Curva analítica para a determinação amperométrica dos teores de catalase com concentrações variando entre 100 e 5000 UI mL^{-1} .	194
Figura 85: Curva analítica para a determinação amperométrica diferencial dos teores de catalase com concentrações variando entre 100 e 5000 UI mL^{-1} .	194
Figura 86: Diagramas para a determinação amperométrica de catalase nas amostras de mel. Em azul, sinais amperométricos referente ao consumo do padrão de H_2O_2 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) pela catalase presente nas amostras; em vermelho, os sinais referentes ao mesmo padrão de H_2O_2 , sem passar pelo reator enzimático.	196
Figura 87: Distribuição dos teores de catalase (UI mg^{-1}) em torno da média para a determinação amperométrica diferencial.	201
Figura 88: Comparação entre os resultados obtidos para os teores de catalase e H_2O_2 quantificados pela metodologia espectrofotométrica e amperométrica para as 17 amostras de mel.	203
Figura 89: Comparação entre os resultados obtidos para os teores de catalase e H_2O_2 quantificados pela metodologia espectrofotométrica e amperométrica para 14 amostras de mel (excluíram-se os exemplares; Laranjeira Japão, Rengue e Velame, para correlação).	204
Figura 90: <i>Box and Whiskers</i> dos teores de H_2O_2 (espectrofotometria e amperometria) e catalase analisados na pesquisa e sua classificação geográfica (intervalo de confiança 95%).	205
Figura 91: <i>E-test</i> [®] (<i>Epsilometer test</i>).	212
Figura 92: Esquema de preparo do inóculo e semeadura das bactérias em meio aeróbico a $35,5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h em ágar Mueller Hinton (MHA).	217

Figura 93: Esquema do preparo do inóculo para os testes de macrodiluição em caldo e avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) bacteriostática ou bactericida para as amostras de mel estudadas. 219

Figura 94: Representativo *in vitro* do teste de difusão em ágar Mueller Hinton para avaliação do potencial antimicrobiano de diferentes amostras de mel (100%) contra linhagens bacterianas. (A) *Staphylococcus epidermidis* ATCC[®] 12228, (B) *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213, (C) *Salmonella tiphy* ATCC[®] 19430 e (D) *Escherichia coli* ATCC[®] 11229. 222

Figura 95: Representativo *in vitro* do teste de diluição em caldo Mueller Hinton e determinação do CIM contra as amostras bacterianas selecionadas no teste de difusão em ágar. Da esquerda para direita: controle (C) e concentrações do mel a 2, 3, 4, 5, 10, 20 e 30 % (v/v). (A): Ausência de crescimento na diluição de 30% (v/v) e (B) crescimento bacteriano em toda a série pela turvação do meio de cultura. 224

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos estabelecidos pela Instrução Normativa 11 do MAPA.	31
Tabela 2: Patógenos e infecções que já demonstraram sensibilidade microbiológica ao mel.	46
Tabela 3: Alguns elementos inorgânicos quem funcionam como co-fatores enzimáticos.	56
Tabela 4: Algumas coenzimas transportadoras transitórias de átomos ou grupos específicos.	57
Tabela 5: Pesos moleculares aproximados de enzimas e seus substratos.	58
Tabela 6: Classificação internacional das enzimas.	61
Tabela 7: Nome comercial, origem botânica e geográfica das amostras analisadas na pesquisa, informados pelos fornecedores dos méis.	78
Tabela 8: Resultado da análise palinológica para investigação microscópica das 17 amostras de mel.	81
Tabela 9: Concentrações de H_2O_2 ($\mu g\ g^{-1}$), intervalos de confiança ($\alpha = 0,05\%$), coeficientes de variância (CV) e o resultado dos testes de recuperação para as medidas espectrofotométricas das 17 amostras de mel.	126
Tabela 10: Concentrações de H_2O_2 ($\mu g\ g^{-1}$), intervalos de confiança ($\alpha = 0,05\%$), coeficientes de variância (CV) e o resultado dos testes de recuperação para as medidas amperométricas das 17 amostras de mel.	157
Tabela 11: Comparação entre origem geográfica e botânica e as determinações espectrofotométrica e amperométrica de H_2O_2 nas 17 amostras comerciais de mel, além dos valores calculados para o teste F e t para um nível de confiança de 95% ($\alpha=0,05$) entre os dois métodos.	161
Tabela 12: Avaliação qualitativa do grau de correlação de Pearson entre duas variáveis.	162
Tabela 13: Comparação entre parâmetros e metodologias para a determinação de H_2O_2 em amostras de mel.	162

Tabela 14: Concentrações de Catalase (UI mg^{-1}), intervalos de confiança ($\alpha = 0,05\%$), coeficientes de variância (CV) e o resultado dos testes de recuperação para as medidas amperométricas das 17 amostras de mel.	198
Tabela 15: Correlação entre origem geográfica e botânica, os níveis de H_2O_2 (determinação espectrofotométrica e amperométrica) e catalase em 17 amostras comerciais de mel.	202
Tabela 16: Valores da escala de Mc Farland, em relação ao número e a composição do tubo e sua correspondência em número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC mL^{-1}).	216
Tabela 17: Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> das 17 amostras de mel (100%) e o diâmetro (mm) dos halos de inibição.	221
Tabela 18: Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> e CIM (% v/v) de avaliação do potencial antimicrobiano das amostras de mel que obtiveram melhores resultados no teste de difusão em ágar.	223

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácido (s)
Am-NH ₂	4-Aminoantipirina
AO	Ácido (s) Orgânico (s)
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APQ	Anti-Pirilquinonimina
ATCC [®]	<i>American Type Culture Collection</i>
CAC	<i>Codex Alimentarius Commission</i>
CAT	Catalase
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CE	Eletroforese Capilar
CH	Carboidrato (s)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CV	Coefficiente (s) de Variância (s)
DNA	Ácido Desoxi-Ribonucléico
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EN	Enzima (s)
FIA	Análise por Injeção em Fluxo ou <i>Flow Injection Analysis</i>
FRU	Frutose
GC	Cromatografia Gasosa
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massa
GLI	Glicose
GLU	Glutaraldeído
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IHC	<i>International Honey Commission</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MHA	Ágar Mueller Hinton
MHB	Caldo Mueller Hinton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
ORSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Oxacilina Resistente
POD	Peroxidase
PhOH	Fenol
ppm	Partes por Milhão (mg kg^{-1} ou mg L^{-1})
qsp	Quantidade Suficiente Para
S	Desvio Padrão
S _b	Desvio Padrão do Branco
TSA	Ágar Triptcaseína Soja ou Ágar Soja
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UI	Unidades Internacionais
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
VRE	<i>Enterococcus spp.</i> Vancomicina Resistente

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.	29
1.1. Mel.	30
1.1.1. <i>Conceito, Composição e Controle de Qualidade Físico-Químico.</i>	30
1.1.2. <i>Melissopalínologia: Análise Polínica.</i>	32
1.1.3. <i>Enzimas.</i>	38
1.1.4. <i>Atividade Antimicrobiana e Terapêutica.</i>	42
1.2. Enzimas.	54
1.2.1. <i>Conceito, Propriedades e Aspectos Gerais.</i>	54
1.2.2. <i>Imobilização Enzimática.</i>	61
1.2.3. <i>Métodos de Imobilização.</i>	63
1.2.4. <i>Parâmetros que Influenciam a Imobilização Enzimática.</i>	68
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.	70
3. ANÁLISE PALINOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE MEL (MELISSOPALINOLOGIA).	74
3.1. Introdução.	75
3.2. Materiais e Métodos.	76
3.2.1. <i>Reagentes e Soluções.</i>	76
3.2.2. <i>Instrumentação.</i>	76
3.2.3. <i>Amostras.</i>	77
3.2.4. <i>Metodologia Analítica.</i>	79
3.3. Resultados e Discussões.	80
3.4. Considerações Finais.	84
4. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM AMOSTRAS DE MEL.	85
4.1. Introdução.	86

4.2. Materiais e Métodos.	87
4.2.1. <i>Reagentes e Soluções.</i>	87
4.2.2. <i>Instrumentação.</i>	88
4.2.3. <i>Imobilização Enzimática e Construção dos Reatores Tubulares.</i>	89
4.2.4. <i>Sistema de Injeção em Fluxo Associado aos Reatores Tubulares com Detecção Espectrofotométrica.</i>	92
4.2.5. <i>Metodologia Analítica.</i>	95
4.3. Resultados e Discussões.	98
4.3.1. <i>Estudo da Concentração de Fenol, 4-Aminoantipirina e Peroxidase.</i>	98
4.3.2. <i>Estudo da Imobilização da Peroxidase em Diferentes Resinas.</i>	101
4.3.3. <i>Estudo da Estabilidade do Reator Enzimático e Reutilização do Suporte.</i>	102
4.3.4. <i>Estudo do Tempo de Imobilização.</i>	113
4.3.5. <i>Estudo da Influência da Temperatura.</i>	114
4.3.6. <i>Estudo de Possíveis Interferentes.</i>	115
4.3.7. <i>Efeito da Diluição na Geração do H₂O₂.</i>	116
4.3.8. <i>Curva Analítica.</i>	118
4.3.9. <i>Quantificação dos Teores de H₂O₂ em Mel e Testes de Recuperação.</i>	121
4.4 Considerações Finais.	127
5. DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DIFERENCIAL DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM AMOSTRAS DE MEL.	130
5.1. Introdução.	131
5.2. Materiais e Métodos.	132
5.2.1. <i>Reagentes e Soluções.</i>	132
5.2.2. <i>Instrumentação.</i>	133
5.2.3. <i>Sistemas de Injeção em Fluxo Associados aos Reatores</i>	136

<i>Tubulares com Detecção Amperométrica.</i>	
5.2.4. <i>Metodologia Analítica.</i>	137
5.3. Resultados e Discussões.	141
5.3.1. <i>Estudo do Volume de Injeção (Alça de Amostragem).</i>	141
5.3.2. <i>Estudo da Vazão na Presença ou Ausência do Reator</i>	143
<i>Enzimático.</i>	
5.3.3. <i>Estudo da Atividade Enzimática em Diferentes Vazões e</i>	147
<i>Concentrações de H₂O₂.</i>	
5.3.4. <i>Estudo do Percurso Analítico.</i>	149
5.3.5. <i>Testes de Repetibilidade.</i>	151
5.3.6. <i>Curva Analítica.</i>	153
5.3.7. <i>Quantificação dos Teores de H₂O₂ em Amostras de Mel e</i>	155
<i>Testes de Recuperação.</i>	
5.4. Considerações Finais.	158
5.5. Comparação dos Resultados Espectrofotométricos e	159
Amperométricos para a Quantificação dos Teores de H₂O₂ nas Amostras	
de Mel.	
6. DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE CATALASE EM AMOSTRAS DE	165
MEL.	
6.1. Introdução.	166
6.2. Materiais e Métodos.	166
6.2.1. <i>Reagentes e Soluções.</i>	166
6.2.2. <i>Instrumentação.</i>	167
6.2.3. <i>Imobilização Enzimática e Construção dos Reatores</i>	168
<i>Tubulares.</i>	
6.2.4. <i>Sistema de Injeção em Fluxo Associado aos Reatores</i>	170
<i>Tubulares com Detecção Amperométrica.</i>	
6.2.5. <i>Metodologia Analítica.</i>	172
6.3. Resultados e Discussões.	174
6.3.1. <i>Estudo da Imobilização da Catalase em Diferentes Resinas.</i>	174

6.3.2. Estudo da Estabilidade do Reator Enzimático e Reutilização do suporte.	177
6.3.3. Estudo da Influência da Temperatura.	189
6.3.4. Curva Analítica.	191
6.3.5. Quantificação dos Teores de Catalase em Amostras de Mel e Testes de Recuperação.	195
6.4. Considerações Finais.	199
6.5. Comparação dos Teores de H₂O₂ e de Catalase nas Amostras de Mel.	201
7. AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS AMOSTRAS DE MEL.	207
7.1. Introdução.	208
7.2. Materiais e Métodos.	212
7.2.1. Reagentes e Soluções.	212
7.2.2. Coleções de Bactérias.	213
7.2.3. Instrumentação.	214
7.2.4. Metodologia: Teste de Difusão em Ágar e de Diluição em Caldo.	215
7.3. Resultados e Discussões.	220
7.4. Considerações Finais.	224
7.5. Correlação dos Teores de H ₂ O ₂ , Catalase e a Avaliação da Atividade Antibacteriana das Amostras de Mel.	226
8. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.	228
REFERÊNCIAS.	236

1. INTRODUÇÃO

1.1. MEL

1.1.1. Conceito, Composição e Controle de Qualidade Físico-Químico

Mel, do latim *melle*, plural meles ou méis, é um produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colméia. O mel pode ser classificado por sua origem (monofloral ou multifloral), de acordo com o procedimento de obtenção de mel do favo (escorrido, prensado ou centrifugado) ou segundo sua apresentação e/ou processamento (mel, mel em favos, mel com pedaços de favo, mel cristalizado ou granulado e mel cremoso). Sua composição é uma solução concentrada de açúcares com predominância de glicose (GLI) e frutose (FRU). Contém ainda uma mistura complexa de outros carboidratos (CH), enzimas (EN), aminoácidos (AA), ácidos orgânicos (AO), minerais, substâncias aromáticas, pigmentos e grãos de pólen podendo conter cera de abelhas procedente do processo de extração. [1]

Em função da complexidade de sua matriz surge a necessidade da comunidade científica identificar e quantificar outros componentes possivelmente encontrados no mel. A determinação de sua composição química tem vários propósitos analíticos como a verificação da adulteração do alimento, determinação da origem geográfica e botânica e identificação de compostos farmacologicamente ativos. Os dois primeiros exemplos são típicos de controle de qualidade do alimento e o último, um dos mais revistos nas pesquisas, é o estudo do uso potencial do mel na medicina moderna como agente antimicrobiano e antioxidante.

O mel por ser considerado um dos alimentos mais puros da natureza, apreciado por seu sabor característico e considerável valor nutritivo. Seu preço é relativamente alto, o que incentiva muitas vezes a sua adulteração. Sistemáticamente, apicultores e

consumidores têm demonstrado grande preocupação com a qualidade e com constantes adulterações de amostras de mel. [2]

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina regras e legisla acerca do controle de qualidade do mel e as metodologias de análises físico-químicas conforme o especificado pela *Codex Alimentarius Commission* (CAC), *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e *International Honey Commission* (IHC). No Brasil os parâmetros de qualidade do mel estão regulamentados pela Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000 do MAPA (Tabela 1). Esta normalização é baseada nas normas e diretivas do Mercosul (Resolução MERCOSUL GMC, 15/94) as quais estão descritas na Portaria 367 de 4 de setembro de 1997 do MAPA. [1, 3-5]

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos estabelecidos pela Instrução Normativa 11 do MAPA.

Parâmetro	Valores estabelecidos	Métodos de análise
<i>Açúcares redutores</i>	<i>Mel floral: mínimo 65%. Melato ou Mel de Melato: mínimo 60%.</i>	<i>CAC^a /VOL. III, Supl. 2, 1990, 7.1</i>
<i>Umidade</i>	<i>Máximo 20%.</i>	<i>AOAC^b 16th Edition, Rev. 4th, 1998 - 969.38 B</i>
<i>Sacarose aparente</i>	<i>Mel floral: máximo 6%. Melato ou Mel de Melato: máximo 15%.</i>	<i>CAC/Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.2</i>
<i>Sólidos insolúveis em água</i>	<i>Máximo 0,1%. Para mel prensado: máximo 0,5%.</i>	<i>CAC/Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.4.</i>
<i>Minerais (cinzas)</i>	<i>Máximo 0,6%. Melato ou mel de melato: máximo 1,2%.</i>	<i>CAC/Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.5</i>
<i>Acidez</i>	<i>Máximo de 50 meq kg⁻¹</i>	<i>AOAC 16th Edition, Rev. 4th, 1998 - 962.19</i>
<i>Hidroximetilfurfural (HMF)</i>	<i>Máximo de 60 mg kg⁻¹</i>	<i>AOAC 16th Edition, Rev. 4th, 1998 - 980.23</i>
<i>Atividade diastásica</i>	<i>Mínimo 8 na escala de Göthe</i>	<i>CAC/Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.7</i>

(a) *Codex Alimentarius Commission* (CAC). Programa Conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação e da Organização Mundial da Saúde e (b) AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*.

Fonte: Pataca (2006) [5].

O controle e a análise de qualidade das amostras de mel envolvem vários testes como os das características sensoriais (cor, sabor, aroma e consistência) e físico-químicas (umidade, hidrometilfurfural, açúcares redutores, sacarose aparente, minerais, cinzas, viscosidade e atividade diastásica, pH e acidez livre, índice de formol, viscosidade e condutividade). Parâmetros físico-químicos e os respectivos métodos de análise estão destacados na tabela 1. [1, 5]

Diversas publicações e trabalhos descrevem a importância e a necessidade da avaliação físico-química da composição do mel oriunda de vários estados brasileiros, além de pesquisas em amostras internacionais conforme normas citadas acima e demais órgãos reguladores. [2, 4, 5-14]

1.1.2. Melissopalínologia: Análise Polínica

O Brasil possui inúmeras espécies de abelhas nativas (ou indígenas) que exercem importante papel na fecundação de inúmeras espécies vegetais originais de nossa flora. Jataí, irapuã, mombuca, moçabranca, mandaçaia, uruçú, jandira, mirim ou mosquito [11], nomes que podem variar de região para região, são alguns exemplos de abelhas nativas. Estas são geralmente pequenas e menores que a abelha do gênero *Apis* e estão agrupadas em dois principais grupos: *Meliponas* e *Trigonas*. Diferem da abelha *Apis mellifera*, espécie africanizada, também em outros aspectos referentes ao seu comportamento e maneira de construir seus ninhos [15]. No Brasil, a principal produtora de mel é a espécie *Apis mellifera*, que não é originária das Américas, tendo sido aqui introduzida por colonizadores europeus, e a espécie *Tetragonisca angustula* ou abelha de jataí, produtora do mel de jataí. A figura 1 ilustra as mais freqüentes espécies encontradas no Brasil.



Figura 1: Espécies de abelhas encontradas no Brasil: (A) *Apis mellifera* (abelha africana), Fonte: Severns e Commons (2009) [16]; (B) *Melipona quadrifasciata* (mandaçaia), Fonte: Laurino (2009) [15]; (C) *Tetragonisca angustula* (abelha jataí ou mosquitinho), Fonte: Laurino (2009) [15], (D) *Trigona* sp. (irapuã ou abelha cachorro), Contrera (2009) [17].

A análise polínica consiste em um importante marcador geográfico e botânico do mel [12]. O primeiro caso é aplicado exclusivamente a espécies florais que crescem apenas em regiões específicas do planeta [18]. Já a identificação botânica dos méis florais ocorre por análise microscópica que identifica e quantifica os grãos de pólen. Atualmente, existe um grande interesse em se caracterizar o mel através da análise polínica juntamente com a físico-química. A análise polínica depende de grande experiência por parte do analista, já que é desenvolvida através da comparação da

morfologia do pólen com descrições da literatura [19]. A melissopalínologia é uma área aplicada da palinologia que estuda a morfologia dos grãos de pólen (e esporos), principalmente, os aspectos estruturais e esculturais da parede polínica (figura 2). Os grãos de pólen apresentam uma riquíssima variedade de tamanhos, formas e padrões ornamentais na parede, que são típicos para cada grupo ou espécie de plantas [20, 21].

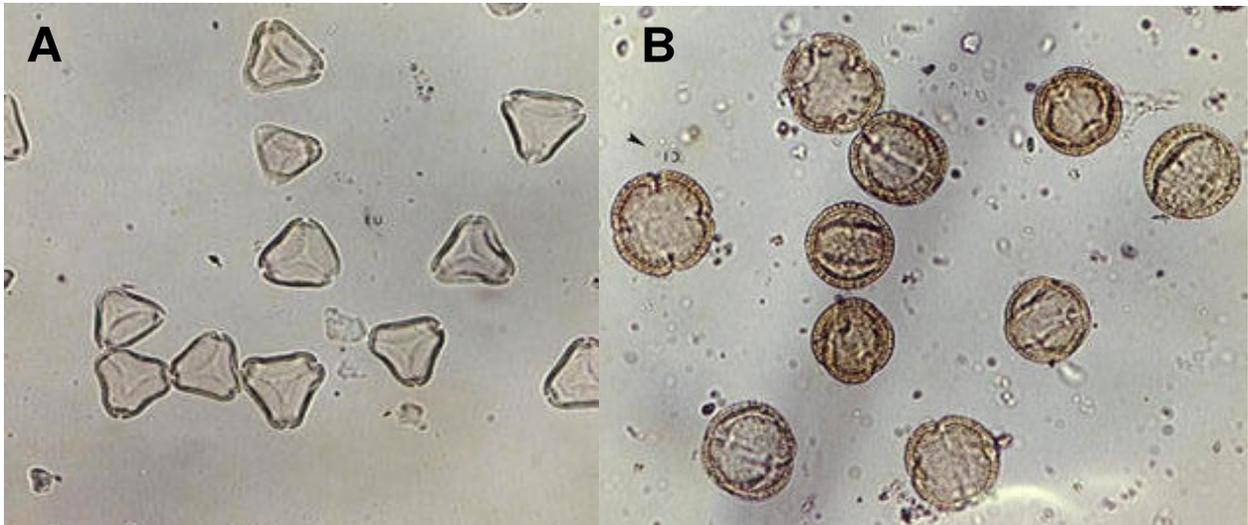


Figura 2: Grãos de pólen de (A) *Eucalyptus* spp. e (B) *Citrus* spp.
Fonte: Laboratório de Abelhas, USP (2009) [21].

O pólen tem sido sempre um assunto de grande interesse para os apicultores. As abelhas coletam o pólen em bolotas, levando-o às colméias e armazenando em alvéolos separadamente do mel, servindo para a sua alimentação e a da cria. Por outro lado ao coletar o néctar das flores, involuntariamente coletam também o pólen, sendo este regurgitado com o néctar nos alvéolos melíferos. Desta maneira o pólen aparecerá no mel, constituindo um importante indicador para sua origem botânica e geográfica. A melissopalínologia pode ser realizada sob duas formas: através da análise qualitativa ou pela análise quantitativa, abrangendo o teor total em grãos de pólen, bem como as relações quantitativas entre o pólen de diferentes espécies ou grupos componentes do espectro polínico da amostra. Geralmente a determinação das famílias vegetais a partir do pólen no mel não constitui grande obstáculo, já quanto aos gêneros, às vezes não são distinguíveis pela morfologia polínica, na maioria dos casos a determinação da espécie fica comprometida, de modo que é preciso limitar-se ao tipo polínico (tipo

morfológico do pólen), a fim de não introduzir erros na análise. Outro fator de “erro” pode ser uma contaminação secundária do néctar ou do mel através de grãos de pólen aderentes ao corpo da abelha, não provenientes de plantas nectaríferas e que se fixaram durante a coleta de pólen ou mesmo durante a visita esporádica em flores não apícolas; outra possibilidade é a contaminação na própria flor da espécie nectarífera, podendo-se fixar, por exemplo, o pólen de plantas anemófilas sobre os óleos que envolvem o pólen e sobre os nectários e o néctar. [22]

A determinação qualitativa e quantitativa das amostras de mel envolve preparação de lâminas microscópicas, e é feita de maneira semelhante ao método padronizado por Louveaux et al. [22-26]. A metodologia será detalhada posteriormente no capítulo 3 (análise palinológica das amostras de mel).

Outra maneira de análise melissopalínológica é a desenvolvida por Erdtman (1960) [27], e adaptada por Iwama e Melhem (1979) [28], conhecida como *técnica acetolítica* ou *acetólise*. O método consiste em preparar o sedimento polínico (proceder como Louveaux et al. [22-26]) e desidratá-lo com ácido acético glacial, permitindo uma maior limpeza da lâmina removendo impurezas, substâncias oleaginosas e todo o conteúdo interno do grão de pólen, com uma melhor visualização da estrutura externa à análise microscópica. Em outras palavras, o tratamento químico que leva a eliminação da intina, do citoplasma e de substâncias aderentes ao grão de pólen, ficando a exina mais transparente e mais própria para o estudo dos seus detalhes. [22, 29, 30]

Durante a análise polínica de uma amostra, os grãos das diferentes espécies são agrupados de acordo com suas freqüências relativas: [22, 23, 31]

- *Pólen dominante*: quando determinada espécie representa mais de 45% do total de grãos de pólen;
- *Pólen acessório*: de 15 a 45%;
- *Pólen isolado*: menos de 15%. Este último grupo é subdividido em: *pólen isolado importante*, de 3 a 15%, e *pólen isolado ocasional*, até 3%.

Entretanto, a análise numérica das amostras de mel fornece dados irreais quanto à percentagem fornecida de néctar das espécies vegetais que contribuíram para a

fabricação do mel. Os fatores de sub e super-representação de espécies polínicas nas amostras não devem ser ignorados. Não existe uma relação geral e constante entre a quantidade de néctar e a de grãos de pólen produzidos pelas plantas, de modo que cada espécie deve ser considerada por si. A representação das plantas, nos espectros polínicos, pode ser dividida em: [22, 31]

- *Plantas sub-representadas*: plantas fornecedoras de muito néctar, mas pouco pólen. Assim, em mel puro destas espécies vegetais encontra-se pouquíssimo pólen e sedimento; poucos grãos já indicam uma grande quantidade de néctar. E.g.: espécies das labiadas (*Hyptis sp.*, a erva-canudo), laranjeiras e frutas cítricas (*Citrus sp.*), mimosáceas (*Acacia sp.*, as acácias); pólen de *Robinia*, *Tília*, *Salvia* e *Medicago*, *Lavandula* e ainda *Rosmarinus*, *Epilobium* e *Cucumis*.
- *Plantas super-representadas*: plantas fornecedoras de pouco néctar, mas muito pólen. Na análise a ocorrência do pólen em grande quantidade indica quantidade bem menor de néctar; em sua avaliação devem-se considerar as outras espécies nectaríferas presentes na amostra. Considera-se mel puro de plantas poliníferas, quando nos espectros polínicos seu pólen representa mais de 98% do total de pólen da amostra. E.g.: várias espécies de eucalipto (*Eucalyptus sp.*), gênero *Mimosa* (espinheiros, sensitiva, bracatinga, etc.), vassourinha (*Borreria verticillata*); gêneros *Castanea*, *Myosotis*, *Cynoglossum*.
- *Plantas com pólen anemófilo*: o pólen é seco e leve, sendo disperso pelo vento e, ocasionalmente procurado pelas abelhas para a coleta em bolotas, não sendo indicador da presença de néctar. Seu pólen ocorre no mel, às vezes em quantidade considerável ou por contaminação, em geral durante os processos de extração do mel, ou mesmo por falsificações. Entretanto, estes grãos de pólen podem ter alguma importância nos espectros polínicos quando, por seu intermédio, podem-se identificar a região geográfica onde foi coletado o mel.

Quanto ao espectro polínico, os méis brasileiros são em geral muito heterogêneos, trata-se de méis de produção corrente ou heteroflorais denominados de *mel silvestre* ou *mil flores*. Méis monoflorais, isto é, cujo néctar é proveniente de uma só espécie botânica, são limitados no Brasil a poucas espécies como os eucaliptos, a laranjeira, etc., e são pouco freqüentes. A fim de poder dar uma ordem às diferentes formas polínicas de uma amostra foram estabelecidos os *tipos polínicos*, às vezes referindo-se ao gênero, às vezes à espécie vegetal. A análise microscópica de amostras de mel à venda no comércio, infelizmente resulta freqüentemente na determinação de falsificações do produto. Estas falsificações geralmente apresentam um elevado grau de viscosidade, falta de odor perfumado característico de um mel verdadeiro, muitas vezes uma elevada acidez, mas não são de uma cor sempre atraente, limpos e transparentes. Quando velhos, entretanto, cristalizam irregularmente em forma de grandes coágulos, tomando um aspecto cinzento repugnante. [22]

Além de grãos de pólen, encontram-se no mel durante a análise microscópica, vários outros elementos figurados, tais como esporos e hifas de fungos (fumaginas), células de algas, pêlos vegetais e de insetos, grãos de amido, diatomáceas, bactérias, células de leveduras, drusas e ráfides de oxalato de cálcio, massa granulosa compacta ou dispersa, partículas de fuligem, poeira e cera de abelhas. Alguns destes elementos são de grande importância para a determinação da presença de *melato* o qual não é proveniente de néctar floral, mas sim de exsudações açucaradas não nectaríferas dos vegetais e de excreções de insetos, principalmente afídeos, sugadores do floema de numerosas espécies vegetais. Estes líquidos açucarados são procurados, colhidos pelas abelhas como se fosse néctar e sofrem os mesmos processos enzimáticos. O produto final, entretanto, é diferente nas suas propriedades físico-químicas e vem a constituir o mel de melato. Este em geral não ocorre de forma pura, estando acompanhado por percentagens variáveis de mel de néctar floral, pois ao mesmo tempo em que as abelhas coletam melato, não deixam de visitar as flores em secreção nectarífera, cujo pólen servirá de indicador de origem geográfica da amostra.

Em inglês, diz-se *honeydew*, em alemão *Honigtau*, em francês *miellat*, em espanhol *mielato* e em italiano *melata*. Segundo informação da *Bee Research Association* não existe palavra equivalente a *honeydew* em português. Na bibliografia

disponível em português encontram-se diversos termos, todos insuficientes para serem aplicados: pseudonéctar, néctar-falso, melaços, falso mel, melado, fezes líquidas açucaradas ou substância açucarada. Entretanto, existe uma forte tendência em considerar que o mel nectarífero (ou simplesmente mel) é oriundo de nectários florais e extra-florais e o mel de melato é o oriundo de excreções de certos homópteros (pulgões). [22].

Inúmeras publicações demonstraram a importância da melissopalinologia no meio científico e na determinação da origem botânica e da qualidade do mel utilizado para o consumo humano: Santos Junior e Santos (2003) [32], Maia et al. (2005) [33], Jilani et al. (2008) [34] caracterizaram o espectro polínico das amostras de mel de regiões da Bahia (Brasil), Alentejo (Portugal) e Kef (Tunísia) pelo método acetolítico [27-29], respectivamente. Enquanto Moreti et al. (2000) [35] e Alves et al. (2006) [36], Soares et al. (2007) [37] e Fujii et al. (2009) [38] fizeram as mesmas determinações, porém pelo método proposto por Louveaux et al. [22-26], em amostras coletadas de áreas do estado da Bahia e Mato Grosso, respectivamente.

1.1.3. Enzimas

As enzimas são, em sua maioria, proteínas que catalisam com grande eficiência as reações biológicas e químicas, acelerando o metabolismo sob condições restritas de pH, temperatura e composição do meio. Possuem um centro ativo, local onde ocorre a reação com o substrato, sendo constituído de resíduos aminoácidos e protéicos. Diversas enzimas estão presentes no mel, e estas são responsáveis pelas mudanças dos teores de carboidratos (principal substrato) nas amostras. A atividade de algumas dessas servem como parâmetro físico-químico de controle, indicativo de qualidade e adulteração, além de revelar períodos de estocagem e aquecimento submetido às amostras. [39-41]

A diastase (α e β -amilase) é uma das enzimas presentes no mel, formada principalmente pelas glândulas hipofaríngeas das abelhas, sendo encontrada também,

em baixa proporção, nos grãos de pólen. Sua função é quebrar a molécula de amido, estando, possivelmente, envolvida na digestão do pólen. O carboidrato é uma mistura de dois polissacarídeos, amilose (constituída de 250 a 300 resíduos de D-glicopirranose, ligadas por pontes glicosídicas α -1,4, que conferem à molécula uma estrutura helicoidal) e amilopectina (constituída de aproximadamente 1400 resíduos de α -glicose ligadas por pontes glicosídicas α -1,4, ocorrendo também ligações α -1,6, que dão a ela uma estrutura ramificada). A figura 3 ilustra de forma esquemática a quebra das ligações α -1,4 do amido, pela enzima diastase, em resíduos de glicose. Sua relevância principal para o mel é que essa enzima apresenta maior sensibilidade ao calor que a enzima invertase, descrita na sequência, sendo recomendada para avaliar a qualidade do mel.

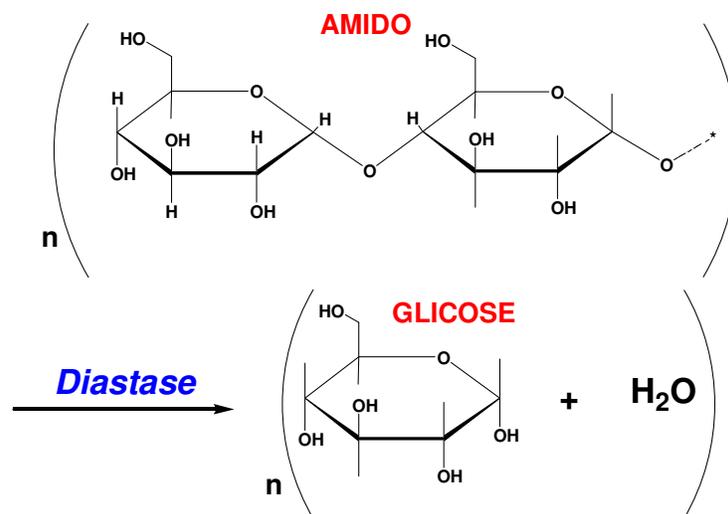


Figura 3: Quebra das ligações α -1,4 do amido, pela enzima diastase (α -amilase), em resíduos de glicose.

Fonte: adaptado de Bogdanov (2010) [39].

Como a diastase apresenta alto grau de instabilidade frente às temperaturas elevadas, sua presença ou não se faz importante na tentativa de detectar possíveis aquecimentos do mel comercialmente vendido, apesar de que também em temperaturas ambientes ela pode vir a deteriorar-se quando o armazenamento for prolongado. White (1992 e 1994) [42, 43] questionou o uso da atividade diastásica como indicadora de qualidade do mel devido à grande variação na quantidade desta enzima em méis recém-colhidos e não aquecidos, sugerindo a exclusão desta análise

de qualidade do mel por ser um teste redundante, enganoso e variável. Os méis produzidos em regiões quentes e secas apresentaram menor atividade de enzimas do que os de regiões quentes e úmidas. [39, 42-44]

Anklam (1998) [18] reforçou a idéia que a diastase foi apenas um indicativo para verificar se o mel passou por um processo de aquecimento, não sendo adequado para indicar a origem da amostra. O teor de HMF revela melhores conclusões frente ao controle de qualidade [18, 39]. De acordo com Crane (1983) [41], níveis enzimáticos mais baixos são encontrados em méis provenientes de rápidos fluxos de néctar, devido ao acúmulo deste material a ser processado no interior da colônia. Entretanto, em situações de fluxo de néctar menos ricos, estes níveis enzimáticos são geralmente mais elevados, pois as abelhas têm tempo para processar intensamente este material. Também se observa que o néctar com um conteúdo alto de açúcar necessita de menos manipulação pelas abelhas para serem convertidos em mel, apresentando assim uma tendência a níveis mais baixos de invertase e diastase. [40, 41, 44]

Para a determinação do índice de diastase utiliza-se a leitura em espectrofotômetro da descoloração da solução de amido, iodo e mel em condições controladas. Quanto mais rápida a descoloração, maior a atividade diastásica da amostra, expressa em unidades da escala Gothe ou Schade por grama de mel. A unidade Gothe é definida como a quantidade de enzima capaz de converter 0,01 g de amido em 1 hora a 40° C. No preparo, a solução final de mel deve ser tamponada visto que em pH < 4,0 a atividade da diastase é inibida. Os parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa 11/2000 (MAPA), conforme especificado pelos órgãos reguladores CAC, IHC e AOAC é no mínimo 8 na escala Gothe (tabela 1) e 3 se o HMF não exceder 15 mg kg⁻¹ de mel. [1-5, 7, 10, 11, 14, 39, 45-48]

A enzima invertase (sacarase, sucrase, α -glicosidase) transforma 75% da sacarose inicial do néctar coletado nos açúcares glicose e frutose (figura 4), ao mesmo tempo, que açúcares superiores são sintetizados, não sendo presentes no material vegetal original. Sua ação é contínua até que o "amadurecimento" total do mel ocorra. Dessa forma, pode-se definir o amadurecimento do mel como a inversão da sacarose do néctar pela enzima invertase e sua simultânea mudança de concentração. A enzima invertase irá permanecer no mel conservando sua atividade por algum tempo, a menos

que seja inativada pelo aquecimento, mesmo assim, o conteúdo da sacarose do mel nunca chega à zero. Essa inversão de sacarose em glicose e frutose produz uma solução mais concentrada de açúcares, aumentando a resistência desse material à deterioração por fermentação e promovendo assim o armazenamento mais eficaz deste alimento altamente energético.

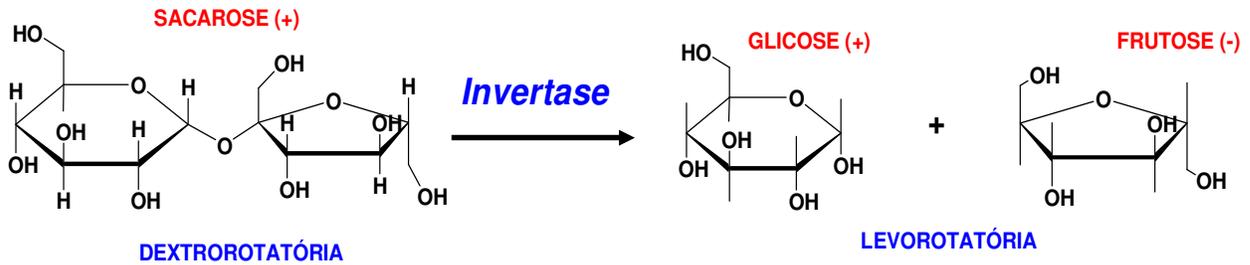


Figura 4: Quebra da sacarose (dextrorrotatória) em glicose e frutose (levorrotatória) pela enzima invertase.

Duas enzimas regulam o teor do peróxido de hidrogênio no mel e conseqüentemente o potencial antimicrobiano das amostras: glicose oxidase e catalase (figura 5). A glicose oxidase tem a função de catalisar a oxidação da glicose, em presença de oxigênio e água, gerando ácido glucônico e H_2O_2 . A enzima, originada nas glândulas hipofaríngeas das abelhas é encontrada praticamente inativada no mel, todavia com a diluição das amostras, sua atividade aumenta, provocando uma maior geração de H_2O_2 , com um natural aumento do poder antibacteriano e anti-séptico das matrizes. A catalase (CAT) por sua vez, proveniente do pólen e néctar das flores, controla negativamente o teor de H_2O_2 decompondo-o em oxigênio e água. Altos níveis de H_2O_2 implicam em elevada atividade de glicose oxidase e baixas concentrações de catalase. [39, 49-54]

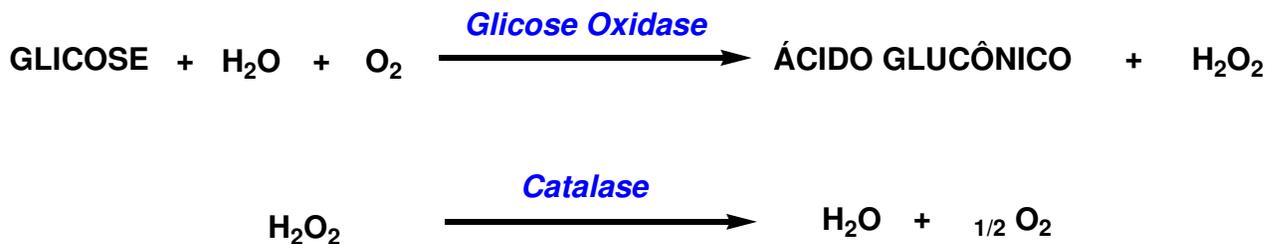


Figura 5: Ações enzimáticas da glicose oxidase e catalase.

Outras enzimas, de menor importância, já foram identificadas no mel como a fosfatase, lipase, lisozimas [55] e inulase; entretanto, as publicações carecem de maiores detalhes frente à origem e real atividade das mesmas. Atualmente a maioria dos artigos limita-se a descrever a atividade e a evolução das representantes principais (diastase, invertase e catalase) [14, 49, 56-60] *in vitro*, sem precisar sua real concentração nas amostras, ou tentar correlacionar atividade antioxidante e/ou antimicrobiana delas com origem botânica e/ou geográfica.

1.1.4. Atividade Antimicrobiana e Terapêutica

A história da utilização do mel pela humanidade é descrita em diversas culturas desde os tempos da pré-história não só como um simples alimento, mas como um eficaz remédio no tratamento das enfermidades [52, 54, 61, 62]. Além das propriedades antioxidantes a atividade antimicrobiana é reconhecidamente a mais importante, e sem dúvida, lidera o *ranking* das publicações relacionadas à ação terapêutica do mel. A ação antimicrobiana do mel abrange um largo espectro de bactérias patogênicas Gram negativas e positivas, descritas tanto com atividade bacteriostática e bactericida, sem deixar de citar o poder antifúngico. Esta notável característica inerente à complexidade de sua matriz que desafia os cientistas a elucidar o real componente ou a conjuntura de fatores que possa explicar a atividade antimicrobiana do mel. As pesquisas revelam de forma pragmática que esta propriedade terapêutica relaciona-se a 5 fatores, divididos em 2 grupos: um chamado de *não-peróxido* (osmolaridade, acidez, componentes fitoquímicos e catalase) e um segundo ligado à presença do peróxido de hidrogênio: [50, 52-54, 63-70]

(A) *Osmolaridade*: o mel é uma solução saturada ou supersaturada de açúcares contendo cerca de 20% de água. A alta concentração de carboidratos disponibiliza poucas moléculas de água para o crescimento e reprodução dos microrganismos sendo considerada um dos fatores atuantes, porém não totalmente determinantes da atividade bactericida das amostras. [50, 52-54, 63-69]

(B) *Acidez*: o mel tem uma característica levemente ácida. O pH medido fica entre 3,2 e 4,5, considerado baixo para o crescimento de vários organismos patogênicos que normalmente sobrevivem entre 7,2 e 7,4. Algumas espécies reproduzem em valores de pH mais baixos, como *Escherichia coli* 4,3, *Salmonella sp.* 4,0, *Pseudomonas aeruginosa* 4,4 e *Streptococcus pyogenes* 4,5. Mesmo assim, o mel puro tem um efeito antibacteriano significativo. Entretanto, quando diluído, especialmente nos fluidos líquidos corporais, os quais são bem tamponados, o pH passa a não ser tão baixo e sua acidez não tem a mesma eficácia no combate de várias espécies de bactérias [50, 52-54, 63-69]. A acidez em grande parte é atribuída à presença dos ácidos orgânicos alifáticos e aromáticos na composição química das amostras. [49, 71-74]

(C) *Componentes Fitoquímicos*: outros fatores *não-peróxidos* contribuem para as propriedades antimicrobianas do mel. Compostos como flavonóides e ácidos fenólicos estão presentes no exsudato extraído pelas abelhas e a ação antimicrobiana depende diretamente da fonte floral das amostras. Diversos flavonóides isolados e identificados no mel estão associados à atividade antibacteriana: pinocembrina, terpenos, álcool benzílico, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzóico (ácido siríngico), metil 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoato (metil siringato), ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico, ácido 2-hidroxi-3-fenilpropionico, ácido 2-hidroxibenzóico e 1,4-dihidroxibenzeno. A atividade antibacteriana do mel em sua porção *não-peróxido* é insensível ao calor, luz e estocagem, permanecendo intacta por longos períodos de conservação. [50, 52-54, 63-69, 75, 76]

(D) *Peróxido de Hidrogênio*: a maior contribuição da atividade antimicrobiana no mel é devida à presença do peróxido de hidrogênio gerado enzimaticamente, junto com o ácido glucônico, através da oxidação da glicose pela glicose oxidase (figura 5). A glicose oxidase é uma enzima secretada das glândulas hipofaríngeas das abelhas que auxilia na formação do mel junto com o néctar. O H_2O_2 tem a função de preservá-lo e esterilizá-lo durante seu amadurecimento, entretanto a meia vida na amostra *in natura* é curta devido à presença de íons metálicos e agentes antioxidantes (e.g. ácido ascórbico), que catalisam sua decomposição em oxigênio e água. O mel só apresentará

teores ativos de H_2O_2 quando diluído, com um conseqüente aumento no poder anti-séptico e antibacteriano da ordem 2.500 a 50.000 vezes, sem causar qualquer dano tecidual se aplicado com a finalidade terapêutica. Em solução, a atividade da enzima nas amostras aumenta, gerando mais H_2O_2 , entretanto destaca-se que em valores baixos de pH, ou quando o mel é estocado de maneira irregular, sem a devida proteção da luz e calor, a glicose oxidase e o H_2O_2 podem ter suas atividades comprometidas. [50, 52-54, 63-70]

(E) *Catalase*: Weston (2000) [53] revisou a importância da enzima catalase, sua influência nos teores de H_2O_2 e a conseqüente atividade antibacteriana do mel [118]. Sua contribuição como um fator antimicrobiano foi investigada em estudos anteriores de White, Subers e Schepartz (1963) [70] e Dustman (1971) [51]. A CAT atua de modo indireto e controla a concentração de H_2O_2 , pois é responsável por sua oxidação em oxigênio e água (figura 5). Distintamente da glicose oxidase, a fonte de CAT não está nas abelhas ou néctar e sim originada no pólen das flores. A quantidade de glicose oxidase apresenta níveis semelhantes nas mais diversas espécies de abelhas no mundo, desde que as formas de produção do mel sejam realizadas sob as mesmas condições. Já os níveis de CAT podem ser mais susceptíveis a mudanças, uma vez que dependeria de quanto pólen seria coletado pelas abelhas e da fonte floral. Sua alta atividade, então, é responsável pela diminuição do H_2O_2 no mel. Conseqüentemente, a concentração do peróxido poderia ser determinada por um balanço enzimático entre os respectivos níveis e as atividades de glicose oxidase e catalase nas amostras. [53]

Weston (2000) [53] também destacou os peroxiácidos originados da reação entre o H_2O_2 e ácidos benzóicos, no mel. Estes não são destruídos pela CAT, por falta de seletividade desta ao substrato, e são mais estáveis que o H_2O_2 ao calor, luz e estocagem. Os ácidos peroxicarboxílicos têm maior poder antimicrobiano, especialmente em valores baixos de pH, contudo sua determinação e avaliação terapêutica ainda não está bem estabelecida. [53]

Em face destes fatores, a comunidade científica expõe inúmeras pesquisas com o intuito de elucidar a composição química do mel e correlacioná-las com suas propriedades farmacoterapêuticas. Um dos grupos pioneiros nestes estudos está na Nova Zelândia, na Universidade de Waikato: *Waikato Honey Research Unit* –

Department of Biological Sciences. Comandado pelo professor Peter Charles Molan e colaboradores, a instituição disponibiliza em seu *site*: <http://bio.waikato.ac.nz/honey/> uma excelente coletânea acerca do uso e as propriedades do mel. Especificamente, o mel monofloral extraído de uma planta nativa do país: Manuka (*Leptospermum scoparium*: Myrtaceae) - figura 6. [54, 77-82]

Como interesse do grupo destaca-se: o desenvolvimento de métodos para identificar a fonte floral do mel e sua composição química, comparar os métodos e sua confiabilidade, investigar os principais oligossacarídeos e flavonóides nas amostras de mel Manuka, avaliar as atividades antimicrobianas contra bactérias, fungos e protozoários, isolar e caracterizar componentes antibacterianos ativos no mel Manuka, assegurar a eficácia das propriedades antibacterianas do mel contra infecções e feridas causadas por bactérias e/ou fungos que não respondam aos antibióticos tradicionais, desenvolver curativos para úlceras na perna, enxertos, chagas, feridas e queimaduras a partir do mel, estudar os componentes antioxidantes e antiinflamatórios das amostras, testar clinicamente o mel em diversas outras aplicações como no tratamento de eczemas, acnes, gengivites, halitose, cáries, gastroenterites, problemas oftalmológicos, etc.. O grupo neozelandês acredita que grande parte das propriedades farmacológicas de seu mel provém de um fator *não-peróxido*, associado a um ou mais componentes fitoterápicos extraídos da planta *Leptospermum scoparium* das abelhas para as amostras. [54, 65, 66, 77-82]



Figura 6: Flor de Manuka (*Leptospermum scoparium*: Myrtaceae).
Fonte: NZ Plant Pics (2010) [82].

Terapeuticamente, o mel é usado como agente adjuvante e promotor de cicatrização em feridas, úlceras e queimaduras superficiais. Testes de susceptibilidade e de avaliação antimicrobiana (tabela 2) contra as mais variadas linhagens de fungos e bactérias com potencial patogênico evidenciam a eficácia dos preparados terapêuticos a base de mel, inclusive em relação à sua segurança microbiológica.

Tabela 2: Patógenos e infecções que já demonstraram sensibilidade microbiológica ao mel.

Patógeno	Infecção causada
<i>Bacillus anthracis</i>	antraz
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	difteria
<i>Escherichia coli</i>	diarréia, septicemia, infecção urinária e em feridas
<i>Haemophilus influenzae</i>	infecção de ouvido, meningite, infecção respiratória e sinusite
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	pneumonia
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	tuberculose
<i>Proteus sp.</i>	septicemia e infecção urinária
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	infecção urinária e em feridas
<i>Salmonella sp.</i>	diarréia
<i>Salmonella cholerae-suis</i>	septicemia e infecção urinária
<i>Salmonella typhi</i>	febre tifóide
<i>Salmonella typhimurium</i>	infecção em feridas
<i>Serratia marcescens</i>	septicemia e infecção em feridas
<i>Shigella sp.</i>	disenteria
<i>Staphylococcus aureus</i>	abscessos, bolhas, impetigo, bolhas e infecção em feridas
<i>Streptococcus faecalis</i>	infecção urinária
<i>Streptococcus mutans</i>	cáries dentais
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	infecção de ouvido, meningite, pneumonia e sinusite
<i>Streptococcus pyogenes</i>	infecção de ouvido, impetigo, febre puerperal e reumática, escarlatina, dor de garganta e infecções em feridas
<i>Vibrio cholerae</i>	cólera
<i>Actinomyces pyogenes, Klebsiella pneumoniae, Nocardia asteroides, Staphylococcus aureus, Streptococcus agal., dysgal., uber</i>	mastitis
<i>Epidermophyton floccosum, Microsporum canis, M. gypseum, Trichophyton rubrum, T. tonsurans, T. mentagrophytes var. ?</i>	tineas
<i>Escherichia coli, Salmonella, Shigella, Vibrio, Helicobacter pylori</i>	úlceras pépticas

Fonte: Bogdanov (2009) [50], The University of Waikato (2009) [54] e Molan (1992) [65, 66].

Entretanto, alguns questionamentos intrigam e desafiam os cientistas tais como: quem realmente provoca este efeito: o peróxido de hidrogênio ou o conjunto de fatores classificados como *não-peróxido*? Em que concentração o mel tem maior atividade antimicrobiana? Como a fonte floral e geográfica pode influenciar nesta atividade? Como caracterizar e isolar componentes? Quais as vantagens em desenvolver

fármacos e preparações médicas? Elas são uma alternativa viável, segura e eficaz aos tratamentos tradicionais?

Antes da utilização do mel como agente terapêutico é importante selecionar e avaliar em laboratório as amostras com maior atividade antibacteriana, que além de ser determinada pelos fatores acima expostos, também pode ser influenciada por sua origem floral e a diluição das mesmas. Esta diluição representa o “número de inibição” e refere-se ao grau com que o mel mantém sua atividade antibacteriana. Cada grupo de pesquisa aprecia a melhor metodologia e as bactérias a serem estudadas. [54]

Como exemplo, o *Waikato Honey Research Unit* pesquisa a atividade contra espécies de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, nas mais variadas concentrações e condições de preparo dos méis (e.g. com e sem H₂O₂). Resultados satisfatórios foram obtidos, com pequenas diferenças entre a sensibilidade para as bactérias estudadas. [54]

Em comparação a outras fontes florais, o mel Manuka, de um modo geral alcançou melhores resultados em uma diluição 10% (v/v). Um resultado notável foi a inibição de crescimento do principal causador de infecções em feridas cutâneas (*S. aureus*), mesmo com uma diluição de 54 vezes do mel utilizado. Outras possíveis aplicações foram citadas com sucesso no combate a mastites em cabras e vacas leiteiras e o tratamento de úlceras pépticas, gastroenterites e dispepsias. [54]

O *Helicobacter pylori*, principal causador de úlceras gástricas teve o crescimento completamente inibido, em testes de concentração inibitória mínima (CIM) em ágar, na diluição 5% (v/v) pós 72h de incubação. O mel é conhecido por aliviar os sintomas das gastroenterites em crianças como ótimo re-hidratante oral em casos graves de diarreia, devido ao elevado teor de glicose, entretanto existe pouca informação a respeito da atividade antibacteriana frente aos gêneros de cepas de *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* e *Yersinia*. Significativos resultados mostraram tanto atividade bacteriostática (inibição do crescimento) quanto bactericida (morte da bactéria) associada aos níveis de H₂O₂ e fatores *não-peróxido* nas amostras da Nova Zelândia. Por fim, a atividade antifúngica do mel contra fungos dermatófitos causadores de micoses superficiais (*tineas*) como *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*

também foi investigada com sucesso na inibição do crescimento destes microrganismos em várias concentrações inibitórias de acordo com o patógeno e a condição experimental do mel utilizado. [54]

A variedade de patógenos e pesquisas contempladas com o mel não se restringem apenas ao néctar extraído da flor Manuka e/ou ao grupo da Oceania. Cientistas de todo o mundo buscam as respostas do poder antimicrobiano do mel e como usar esta extraordinária característica ao combater infecções na terapêutica medicinal moderna.

Willix, Molan e Harfoot (1992) [83] estudaram as 7 principais bactérias causadoras de infecções em feridas e compararam o efeito *não-peróxido versus* peróxido. Concluíram que o crescimento de cepas de *S. aureus* foi inibido totalmente por vários tipos de mel em concentrações inferiores a 11% (v/v) [83]. Bogdanov (1997) agregou a acidez (efeito não-peróxido) do mel à atividade antimicrobiana contra espécies do tipo *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*, mas não a correlacionou com o pH, sugerindo que parte da atividade se deve a origem botânica das amostras [64]. Weston e colaboradores, em duas oportunidades (1999 e 2000) [84, 85], referiram-se aos extratos fenólicos do mel de Manuka, previamente identificados por HPLC. O flavonóide metilsiringato foi o principal constituinte e marcador botânico da espécie (70% m/m). Os pesquisadores colocaram em dúvida a atividade antibacteriana do mel associada aos componentes fitoterápicos, citaram e isolaram outras substâncias, especialmente ácidos orgânicos e carboidratos, como os possíveis responsáveis da atividade antimicrobiana ao mel Manuka [84, 85].

Shamala, Jyothi e Saibaba (2002) [86] estudaram *in vitro* e *in vivo* (ratos) o potencial antibacteriano de amostras de mel da Índia inibindo o crescimento de *Escherichia coli* [86]. Miorin et al. (2003) [87] compararam em méis e própolis brasileiros de abelhas africanizadas e jataí o poder antimicrobiano contra *S. aureus*. Mesmo a própolis com um resultado pouco mais eficaz que as amostras de mel, a pesquisa projeta a importância de novos estudos para a aplicação clínica dessas matrizes [87]. Vinte e sete amostras de mel de diferentes fontes florais e geográficas foram avaliadas e sua habilidade testada contra microrganismos patógenos (*Bacillus cereus*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* Ser. Typhimurium e *S. aureus*) e

que aceleram a deterioração de alimentos (*Alcaligenes faecalis*, *Aspergillus niger*, *Bacillus stearothermophilus*, *Geotrichum candidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Penicillium expansum*, *Pseudomonas fluorescens*). Novamente resultados demonstraram a atividade antimicrobiana das amostras, sem atribuição específica de origem, porém indicaram o potencial do mel como conservante de alimentos processados [88]. Lusby, Coombes e Wilkinson (2005) [89] utilizam o teste de diluição em ágar contra 13 bactérias e 1 fungo para cinco concentrações inibitórias estudadas entre 0,1 e 20% (v/v), com o valor de 5% de inibição mínima. A atividade bacteriostática verificada não inibiu o crescimento de apenas 2 espécies bacterianas (*Serratia marcescens* e *Candida albicans*). Os melhores resultados foram obtidos com as amostras Medihoney[®] e Manuka [89].

O impacto da atividade antibacteriana do H₂O₂ foi determinado avaliando seus níveis ante e pós remoção pela enzima catalase e ao correlacionar os valores com a inibição do crescimento das bactérias estudadas [54]. Brudzynski (2006) [90] verificou que o H₂O₂ foi o principal responsável por este efeito em amostras canadenses contra cepas de *E. coli* e *B. subtilis*. A remoção pela CAT reduziu a atividade antimicrobiana, mas a enzima não foi capaz de consumir todo o H₂O₂ endógeno das amostras de mel, mantendo um efeito inibidor residual associado a este fator [90].

A atividade antifúngica contra *Candida spp.* foi associada ao mel por Irish et al. (2006) [91]. Destacam a importância terapêutica do uso especialmente em espécies de achados clínicos [91]. Uma das grandes limitações do uso do mel foi a administração por via oral, visto que a diluição da amostra no ambiente intestinal e em outros fluidos e tecidos orgânicos reduziu substancialmente a atividade antimicrobiana [54]. Entretanto, o próprio grupo neozelandês verificou a inibição do patógeno *Campylobacter spp.* a uma concentração inferior a 1% (v/v) de mel. O baixo valor do CIM sugeriu efeito contra a campilobactéria mesmo após a diluição do mel nos fluidos e intestino, contudo a real concentração do mel nestes locais deveria ser estabelecida. [92]

Lee, Churey e Worobo (2008) [93] discutiram a possibilidade da atividade antibacteriana do mel estar associada às próprias bactérias isoladas do alimento e localizadas ali desde sua colheita e produção (e.g. *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis, *Vibrio*

parahaemolyticus e *Byssochlamys fulva*). Por um processo competitivo com a produção de componentes antibacterianos, estas inibiram o crescimento de inúmeros patógenos, fornecendo uma nova linha de pesquisa para a busca de outros fatores responsáveis pelo poder antimicrobiano do mel. Na investigação, mais de 2000 bactérias foram isoladas de 8 amostras comerciais (Estados Unidos e Nova Zelândia), das quais 92,5% exibiram ação antibacteriana contra pelo menos um dos microrganismos estudados [93]. Outras pesquisas completaram e aprofundaram os estudos relacionando a atividade antimicrobiana às amostras de mel de diversas procedências em todo o planeta [94-114].

Outro foco dos estudos são as chamadas bactérias multi-resistentes ou *superbugs*. Estes microrganismos podem ser genericamente definidos como aqueles que não são susceptíveis aos antibióticos de primeira escolha. Os exemplos mais comuns, no ambiente hospitalar, são as cepas Gram positivas de *Staphylococcus aureus* metilicilina (MRSA) e oxacilina (ORSA) resistentes e *Enterococcus spp.* vancomicina resistente (VRE). As Gram-negativas, como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*, são resistentes aos aminoglicosídeos. Existe grande variação no padrão de susceptibilidade destes agentes e esta resistência pode se estender a múltiplos antibióticos, inclusive aos de última geração. [115, 116]

O desenvolvimento de cepas resistentes a antibióticos se dá por mutação genética natural ou induzida e as cepas mutantes criam diversos mecanismos de inibição da atividade dos antimicrobianos. O uso indiscriminado de antibióticos induz a uma pressão seletiva sobre as cepas bacterianas, favorecendo a preservação das cepas que sofreram mutação genética para a resistência em relação às cepas sensíveis. A disseminação destes agentes ocorre, particularmente quando as medidas básicas no controle das infecções hospitalares não são respeitadas, de maneira cruzada, através dos profissionais de saúde, tanto pelo contato direto entre um paciente e outro, como pelo contato indireto devido ao manuseio de artigos ou superfícies contaminadas. [115, 116]

Cooper et al. em 5 trabalhos [117-121] isolaram bactérias multi-resistentes de vários achados clínicos e avaliaram a atividade antimicrobiana frente a várias amostras

de mel e aos antibióticos comumente usados. *Staphylococcus aureus* coagulase-positiva e coagulase-negativa, MRSA e VRE, *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* foram os principais alvos do estudo originários de queimaduras, feridas, úlceras epidérmicas, fluidos peritoneal e cérebro-espinhal, aspirados pulmonares, culturas sanguíneas e instrumentações médicas invasivas (e.g. cateteres, sondas e próteses). Em média, concentrações inferiores a 10 % (v/v) inibiram o crescimento das diversas linhagens, o que reforçou a importância dos fatores não-peróxido, exceto a osmolaridade, nas amostras quando diluídas. As pesquisas projetaram a importância do mel no tratamento de feridas, especialmente quando infectadas por patógenos multi-resistentes.

Recentemente, Alandejani et al. (2009) [122] estudaram a susceptibilidade de cepas *S. aureus* resistentes e susceptíveis à meticilina e *P. aeruginosa* extraídos de biofilmes produzidos pelas mesmas e indicadores fisiopatológicos de sinusite crônica. A atividade bactericida encontrada atingiu 63-73% e 91% para MRSA e *P. aeruginosa*, respectivamente. Mais uma vez o alimento foi destacado com alternativa terapêutica de baixo custo e não-tóxica em casos de sinusite crônica contra estas espécies patogênicas e de potencial multi-resistentes. [122]

Sem dúvida, o tratamento de feridas infectadas continua sendo um tema de grande importância médica, particularmente na prática cirúrgica, numa época em que o uso indiscriminado de antimicrobianos tem dificultado o tratamento hospitalar dos pacientes, com repercussão no aparecimento cada vez maior de microrganismos resistentes. [123, 124]

Diversas terapias alternativas têm sido testadas, dentre as quais o uso tópico de substâncias derivadas do mel tem apresentado resultados promissores e lidera as pesquisas relacionadas a este efeito terapêutico. Sua atividade antibacteriana e facilitadora da cicatrização no tratamento de feridas e queimaduras deve-se principalmente ao atuar como importante barreira viscosa, de alta osmolaridade, impedindo a entrada de substâncias e a perda de fluidos para o meio externo [124]. Como vantagem imediata, a facilidade da aplicação dos preparados pelos próprios pacientes em casa, redução do custo de materiais no tratamento inclusive na utilização de antibióticos e a rápida cicatrização evita a intervenção cirúrgica na aplicação de

enxertos e na chamada *debriding action* (remoção de tecidos e fragmentos mortos ou contaminados) [125-128]. A figura 7 ilustra a evolução do processo de cicatrização a partir da aplicação de um produto farmacêutico a base de mel no curativo em um paciente com infecção pós-cirúrgica [129].

As amostras comerciais ou para alimentação não devem ser utilizadas com este objetivo. O mel de qualidade farmacêutica passa por um rigoroso processo farmacotécnico de extração, fracionamento e estabilização, esterilização por gama-irradiação até a obtenção da forma semi-sólida para ser utilizada com a finalidade médica [125, 130]. Outras apresentações encontradas tais como gel cicatrizante, creme para eczemas, gazes, xampus, loções, cremes cosméticos para o rosto, mãos e massagem são relatadas; além das formas pouco usuais associadas para combater infecções virais (e.g. herpes) nos lábios e nas genitálias, bolhas e furúnculos, câimbras e contusões musculares [125].



Figura 7: Ferida em paciente, portador de leucemia mielóide aguda, submetido à toracotomia com infecção pós-cirúrgica local. Preparação farmacêutica a base de mel foi aplicada em curativo com alginato de cálcio. Cicatrização da ferida em 24 horas. Fonte: Simon et al. (2009) [129].

Alguns trabalhos nessa linha de pesquisa puderam ser destacados nos últimos anos: Subrahmanyam (1998) [131] fez um importante estudo clínico e histológico no tratamento de queimaduras com mel e sulfadiazina de prata, um poderoso agente cicatrizante. A regeneração epidérmica é um processo complexo e a prevenção de infecção é o principal objetivo no tratamento das queimaduras. Em comparação com o medicamento comercial, potencial agente antimicrobiano em feridas e queimaduras superficiais, o mel parece ter sido a melhor escolha para o tratamento tópico. Além de

promover uma rápida re-epitalização e um decréscimo da reação inflamatória, sendo uma alternativa paliativa que envolve baixos custos e rápidos resultados [131].

Simon et al. (2006 e 2009) [129, 132] em duas oportunidades exemplificaram o uso do mel no processo de cicatrização de feridas. No primeiro trabalho, em 3 anos de estudo, o Departamento de Pediatria Oncológica, Hospital da Criança, Bonn, Alemanha, realizou testes com amostras de Medihoney[®]. Excelentes resultados demonstraram a habilidade do produto farmacêutico no combate a infecções nosocomiais (hospitalares) e a eficácia do mel em acelerar a cicatrização em pacientes submetidos à quimioterapia, normalmente imunodeprimidos, malnutridos e susceptíveis a infecções por “super” bactérias. [132]

Em 2009, baseado nas experiências clínicas, o grupo fez uma compilação de questionamentos e colocações acerca do uso do mel. Projetou e direcionou a pesquisa aos profissionais da área da saúde, ainda reticentes a esta modalidade terapêutica. Porém assegurou que a eficácia e segurança dos tratamentos só serão completas com o encorajamento de novas investigações clínicas [129]. Na mesma linha, Gethin e Cowman (2008) [133] compararam a eficácia entre o mel Manuka (Woundcare 18+[®]) e a terapia com hidrogel (IntraSite Gel[®]) em 108 pacientes escolhidos ao acaso, com úlceras venosas nas pernas e com dificuldade cicatrização. Os resultados demonstraram a eficácia do mel Manuka frente à terapia com hidrogel em termos de melhor cicatrização e remoção de resíduos/tecidos mortos (*desloughing, debridement*) e menor incidência de infecções. O estudo reforçou o mel Manuka como mais uma opção com benefícios terapêuticos no controle da cicatrização e regeneração de tecidos epidérmicos. [133]

Por fim, Robson, Dodd e Thomas (2009) [134] também compararam com os métodos tradicionais de tratamento com o mel farmacêutico Medihoney[®]. Mais de 100 pacientes escolhidos ao caso foram submetidos aos testes e controles da pesquisa. Novamente, os resultados com o mel na evolução da cicatrização das feridas ratificaram as publicações similares, sugerindo mais uma vez seu potencial terapêutico em aplicações clínicas na medicina moderna. [134]

1.2. ENZIMAS

1.2.1. Conceito, Propriedades e Aspectos Gerais

A maior parte da história da bioquímica é a história da pesquisa das enzimas. A catálise biológica foi reconhecida e descrita pela primeira vez no final do século XVIII, em estudos de digestão da carne pelas secreções do estômago, e a pesquisa continuou em 1800 com exames da conversão de amido em açúcar pela saliva e vários extratos de plantas. Na década de 1850, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por “fermentos”. Em 1887, Eduard Buchner descobriu que extratos de levedura poderiam fermentar açúcar em álcool, provando que a fermentação era promovida por moléculas que continuavam a função quando removida das células. Frederick W. Kühne chamou essas moléculas de *enzimas*. [135]

O isolamento e caracterização da urease por James Sumner em 1926 forneceram um grande avanço aos estudos iniciais das enzimas. Sumner descobriu que cristais de urease consistiam inteiramente de proteínas e postulou que todas as enzimas fossem proteínas. Porém, apenas em 1930 a teoria de Sumner foi totalmente aceita, depois que John Northrop e Moses Kunitz cristalizaram a pepsina, tripsina e outras enzimas digestivas e descobriram que elas também eram proteínas. Neste período J.B.S. Haldane escreveu um tratado intitulado de *ENZIMAS* sugerindo que as interações das ligações fracas entre a enzima e seu substrato, poderiam ser usadas para catalisar uma reação, conceito atual de catálise enzimática. Desde a segunda metade do século XX, a pesquisa sobre enzimas tem sido intensa. Ela levou a purificação de milhares de enzimas e a elucidação da estrutura e mecanismo químico de muita delas, e o entendimento geral de como elas trabalham. [135]

O conceito de enzimas é amplo e descrito por vários autores:

As enzimas são polímeros biológicos que catalisam processos dinâmicos múltiplos que fazem a vida como nós conhecemos ser possível. Como determinantes das velocidades em que os processos fisiológicos

acontecem, as enzimas desempenham papel fundamental na saúde e na doença. (RODWELL e KENNELLY In: MURRAY et al., 2002, p. 74). [136]

Todas as enzimas são proteínas. Sua atividade catalítica depende da integridade da sua conformação nativa de proteína. Se uma enzima for desnaturada ou dissociada em suas subunidades, a atividade catalítica é usualmente perdida. Se uma enzima é degradada em seus componentes aminoácidos, sua atividade catalítica é sempre destruída. Dessa forma as estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias protéicas das enzimas são essenciais para a sua atividade catalítica. (NELSON e COX, 2006, p. 191). [135]

As enzimas como todas as proteínas, são sintetizadas pelas próprias células, (...), sua presença torna possível a ocorrência, a velocidades apreciáveis, de reações cujas velocidades seriam desprezíveis na sua ausência. (...) Algumas enzimas provocam aumento de até 10^{14} vezes na velocidade da reação que catalisam. (...) As enzimas diminuem a energia de ativação levando a altas velocidades de reação, são muito específicas, são sintetizadas pelas próprias células e têm concentração e atividade moduláveis, permitindo um ajuste fino do metabolismo ao ambiente celular. O conjunto desses aspectos favoráveis possibilita a manutenção da vida, justificando o alto investimento energético necessário para a síntese das enzimas. (MARZZOCO e TORRES, 2007, p. 63). [137]

Enzimas são biocatalisadores com excelentes propriedades tais como elevadas seletividade e especificidade, que lhes permite realizar uma grande variedade de processos químicos sob diversas condições reacionais. Sua função metabólica exerce influência específica sobre certas interações bioquímicas, usualmente em ambientes muito complexos - como no interior de células - e incluem transformações oxidativas e conjugativas que ocorrem em altas velocidades catalíticas e com reações altamente regiosseletivas e estereosseletivas. (CARDOSO, MORAES e CASS, 2009, p. 175). [138]

As enzimas, como as outras proteínas possuem pesos moleculares que variam de 12 kDa a 1000 kDa, sendo que algumas requerem apenas os resíduos de AA para sua atividade, entretanto outras precisam de um componente químico adicional, chamado de co-fator, que pode ser um íon inorgânico (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+}), um complexo orgânico ou molécula metalorgânica, conhecida como coenzima. Tanto a coenzima como o íon metálico é denominado de grupo prostético; que forma uma ligação metálica ou covalente muito forte com a parte protéica da enzima. O grupo prostético numa enzima cataliticamente ativa é chamado de holoenzima, enquanto os resíduos protéicos ou de AA é a parte conhecida como apoenzima ou apoproteína

[135]. Muitas vezes as coenzimas podem ser consideradas como um segundo substrato, isto se deve porque as modificações químicas na coenzima contrabalançam, exatamente, aquelas que ocorrem com o substrato. Por exemplo, numa reação de oxirredução que o substrato é oxidado, a coenzima é reduzida, e em outros casos as reações das coenzimas são as de maior importância fisiológica [136]. As tabelas 3 e 4 mostram os principais co-fatores e coenzimas e algumas de suas funções bioquímicas, respectivamente [135].

Tabela 3: Alguns elementos inorgânicos que funcionam como co-fatores enzimáticos.

<i>Metal</i>	<i>Enzima</i>
<i>Cu²⁺</i>	<i>Citocromo Oxidase</i>
<i>Fe²⁺ ou Fe³⁺</i>	<i>Citocromo Oxidase, Catalase, Peroxidase</i>
<i>K⁺</i>	<i>Piruvato Quinase</i>
<i>Mg²⁺</i>	<i>Hexoquinase, Glicose 6-fosfatase, Piruvato Quinase</i>
<i>Mn²⁺</i>	<i>Argirase, Ribonucleotídeo Redutase</i>
<i>Mo</i>	<i>Dinitrogenase</i>
<i>Ni²⁺</i>	<i>Urease</i>
<i>Se</i>	<i>Glutationa Peroxidase</i>
<i>Zn²⁺</i>	<i>Anidrase Carbônica, Álcool Desidrogenase Carboxipeptidases A e B</i>

Fonte: Nelson e Cox (2006) [135].

Tabela 4: Algumas coenzimas transportadoras transitórias de átomos ou grupos específicos.

Coenzima	Grupos químicos transferidos	Precursos na dieta dos mamíferos
<i>Biotina</i>	CO_2	<i>Biotina</i>
<i>Coenzima A</i>	<i>Grupos Acila</i>	<i>Acido Pantotênico e Outros compostos</i>
<i>5'-desoxiadenosilcobalamina</i> (<i>Coenzima B₁₂</i>)	<i>Átomos de H e Grupos Alquilas</i>	<i>Vitamina B₁₂</i>
<i>Flavina Adenina Dinucleotídeo</i> (<i>FAD</i>)	<i>Elétrons</i>	<i>Riboflavina (Vitamina B₂)</i>
<i>Lipoato</i>	<i>Elétrons e Grupos Acila</i>	<i>Não requerido na dieta</i>
<i>Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo</i> (<i>NAD</i>)	<i>Íon Hidreto (:H⁻)</i>	<i>Ácido Nicotínico (Niacina)</i>
<i>Piridoxal Fosfato</i>	<i>Grupos Amino</i>	<i>Piridoxina (Vitamina B₆)</i>
<i>Tetraidrofolato</i>	<i>Grupos de um Carbono</i>	<i>Folato</i>
<i>Tiamina Pirofosfato</i>	<i>Aldeídos</i>	<i>Tiamina (Vitamina B₁)</i>

Fonte: Nelson e Cox (2006) [135].

Existe uma grande diferença entre o tamanho das enzimas e do substrato, normalmente as enzimas são macromoléculas, enquanto os substratos têm peso molecular de muitas ordens de grandeza inferior (tabela 5). Embora toda a molécula seja importante para o papel catalítico, apenas uma região da enzima, o chamado *centro ou sítio ativo*, que fará a ligação efetiva com o substrato, e é neste local de forma definida que permite o reconhecimento do complexo enzima-substrato (figura 8). A molécula para ser aceita como substrato, deve ter forma espacial adequada para alojar-se no centro ativo e grupos químicos afins, capazes de estabelecer ligações precisas com radicais do centro ativo.

Por muito tempo esse processo de reconhecimento de especificidade foi colocado como um modelo rígido (teoria “chave-fechadura” de Emil Fischer), porém hoje novos conceitos mais amplos explicam a complexidade da relação estabelecida para o reconhecimento enzimático de um substrato. A especificidade enzimática baseia-se nas interações entre a molécula do substrato e o sítio ativo da enzima, como, por exemplo, as ligações de hidrogênio, as interações de Van der Waals e as interações

eletrostáticas. Isto ocorre somente quando várias dessas interações acontecem simultaneamente entre as duas moléculas (enzima e substrato) em uma estrutura tridimensional. O nível de especificidade varia com a enzima considerada, por exemplo, algumas aceitam substratos diversos enquanto outras são exclusivas apenas de uma molécula. [137, 138]

Tabela 5: Pesos moleculares aproximados de enzimas e seus substratos.

Enzima	Substrato	Peso Molecular, Da (aproximado)
<i>Catalase</i>		200.000
	H_2O_2	34
<i>Urease</i>		500.000
	<i>Uréia</i>	60
<i>Fosfofrutoquinase</i>		380.000
	<i>Frutose 6-fosfato</i>	300
<i>Glutamina Sintetase</i>		600.000
	<i>Glutamato</i>	150

Fonte: Marzzoco e Torres (2007) [137].

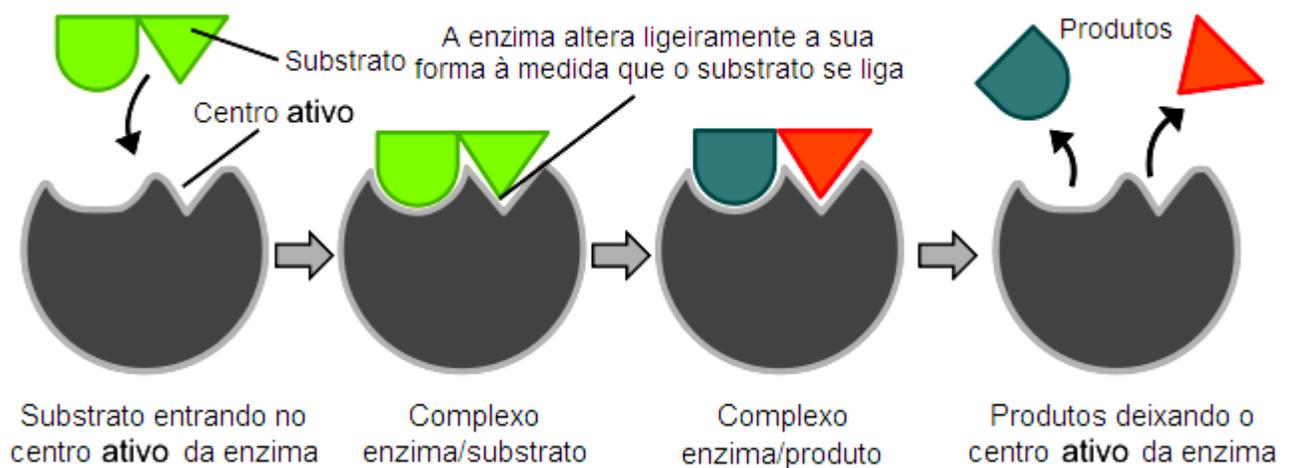


Figura 8: Reconhecimento complexo enzima-substrato.
Fonte: adaptado de Wikipédia – Enzimas (2009) [139].

A velocidade de uma reação química catalisada por uma enzima é dependente de vários fatores. Um deles é a concentração de enzima e substrato. Rodwell e Kenelly (2002) discutiram essa relação e afirmaram que a velocidade inicial é proporcional a concentração enzimática, entretanto para o substrato a velocidade aumenta à medida que a concentração deste aumenta, até um ponto que a enzima é dita “saturada” pelo próprio substrato, a velocidade inicial observada atinge um valor máximo que não é afetado por aumentos ainda iminentes do substrato, visto que este se encontra num alto excesso molar sobre a enzima. A temperatura é outro fator determinante na atividade enzimática e esta é favorecida pela elevação gradual da temperatura devido ao aumento da energia cinética das moléculas reagentes. Eventualmente, todavia, a energia cinética da enzima supera a barreira de energia para romper as fracas ligações de hidrogênio e ligações hidrofóbicas que mantêm sua estrutura secundária e terciária. Nesta temperatura caracteriza-se a *desnaturação* da enzima, com uma concomitante perda de atividade catalítica. A faixa de temperatura na qual a enzima mantém uma conformação competente e estável para catálise gira em torno de 37°C (temperatura corporal humana), entretanto as enzimas exibem atividade em temperaturas de até 45-55°C. [136, 137]

O pH do meio também é um dos múltiplos fatores que influenciam na ação enzimática. A maioria das enzimas apresenta um valor de pH ideal para sua atividade máxima, fazendo com que a velocidade da reação diminua à medida que o pH se afasta desse valor ótimo e característico para cada enzima. Por exemplo, a Pepsina é uma enzima que funciona em pH ótimo de 1,5, já a Fosfatase Ácida esse valor aumenta para 4,5, enquanto a urease e a tripsina apresentam valores ideais em 6,5 e 9,7, respectivamente. Na média, a maioria das enzimas atinge seu ápice de atividade no intervalo entre 5,0 e 9,0, valores extremos podem levar a desnaturação, a alteração da carga elétrica de um resíduo funcional na ligação de um substrato ou até mesmo a mudança de sua estrutura e conformação resultando numa perda de atividade enzimática. [136, 137]

Muitas enzimas são nomeadas pela adição do sufixo *ase* ao nome do seu substrato ou uma palavra ou frase que descreve sua atividade. Dessa forma a urease catalisa a hidrólise da uréia, a lipase hidrolisa as gorduras (do grego *lipos*), amilase o

amido (do grego *amylon*), proteases as proteínas, a DNA polimerase, a polimerização dos nucleotídeos para formar o DNA, a pepsina atua na digestão (do grego *pepsis*), a lisozima era nomeada em função da habilidade de lisar as paredes celulares bacterianas. Outras enzimas foram nomeadas pelos seus descobridores para uma função mais ampla, antes que a reação específica fosse descoberta, por outro lado uma única enzima poderia aparecer com dois ou mais nomes. Por causa dessas ambigüidades e pelo crescente número de enzimas recém-descobertas, os bioquímicos em concordância internacional adotaram um sistema de nomear e classificar as enzimas. Essa classificação divide as enzimas em seis classes, cada uma com subclasse específica, baseada no tipo de reação catalisada (tabela 6). [135, 137]

A cada enzima são atribuídos quatro números para a classificação e um nome sistemático que identifica a reação que catalisa. O número é determinado pela *EC (Enzyme Commission)* ou Comissão de Enzimas sendo que o primeiro dígito indica o nome da classe, o segundo a subclasse, o terceiro a sub-subclasse e o quarto dígito designa a enzima particularmente especificada. Por exemplo, a ATP:glicose fosfotransferase catalisa a fosforilação da D-GLI e tem a numeração EC 2.7.1.1:



De acordo com a classificação é uma transferase, subclasse fosfotransferase, sub-subclasse fosfotransferase com uma hidroxila como receptor e a D-GLI como grupo receptor da fosforila. [135-137]

Tabela 6: Classificação internacional das enzimas.

N^o	Classe	Tipo de Reação Catalisada
1	<i>Oxidoredutases</i>	<i>Transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos de H)</i>
2	<i>Transferases</i>	<i>Reações de transferência de grupos</i>
3	<i>Hidrolases</i>	<i>Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais da água)</i>
4	<i>Liases</i>	<i>Adição de grupos a ligações duplas, ou formação de duplas ligações pela remoção de grupos</i>
5	<i>Isomerases</i>	<i>Transferência de grupos dentro de moléculas para produzir formas isoméricas</i>
6	<i>Ligases</i>	<i>Formação de ligações (C-C, C-S, C-O, C-N) pelas reações de condensação acopladas à clivagem do ATP</i>

Fonte: Nelson e Cox (2006) [135], Marzzoco e Torres (2007) [137].

1.2.2. Imobilização Enzimática

A imobilização de enzimas tem se mostrado, nos últimos tempos, uma poderosa ferramenta para melhorar quase todas as propriedades enzimáticas, como a alta atividade e seletividade. Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula em um reator ou sistema analítico. A imobilização de enzimas a suportes cromatográficos apresenta diversas vantagens, sobre a utilização de enzimas livres em solução, entre as quais destacam-se: a utilização de pequenos volumes de amostra (pL-nL), aumento do tempo de vida e da estabilidade da enzima em relação à temperatura, aos solventes orgânicos e à variação de pH sem perda considerável da atividade catalítica, reutilização, pequeno manuseio da amostra, evitando contaminações e fácil separação da enzima dos produtos da reação. Essas vantagens são úteis nos estudos enzimáticos *on-line*, onde os produtos da reação

enzimática e os inibidores são detectados diretamente por ultravioleta-visível (UV-Vis), fluorescência ou espectrometria de massas. [138]

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-las da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, novas técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas para fornecer a estabilidade das enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização. [138, 140]

Existem duas principais classes de aplicações analíticas da imobilização enzimática. Na primeira classe estão as aplicações biocatalíticas, que utilizam as reações enzimáticas para obter um produto de interesse, ou ainda transformar um analito em uma espécie mais facilmente detectável. A segunda engloba os biorreatores desenvolvidos para triagem de substratos e para os estudos das características cinéticas das enzimas. Esta última tem sido amplamente utilizada para separação e identificação de metabólitos, nos estudos de metabolismo dos fármacos, para análise e síntese enantiosseletiva, na digestão proteolítica de proteínas *on-line*, no controle biotecnológico de fármacos, e para a identificação de substratos e/ou inibidores, na busca por novos ligantes. [138]

Também merece destaque o uso de enzimas imobilizadas como biossensores em aplicações biomédicas ou como órgãos artificiais. Várias revisões na literatura têm abordado os diferentes métodos de imobilização enzimática, suas aplicações industriais na química analítica e na medicina, abordando principalmente os aspectos analíticos das interações enzima-substrato. O histórico do desenvolvimento da imobilização enzimática ao longo do século passado é descrito sucintamente por Cardoso, Moraes e Cass (2009) [138], destacando que a partir da década de 70 inúmeras técnicas foram desenvolvidas impulsionando a aplicação de enzimas imobilizadas. [138]

1.2.3. Métodos de Imobilização

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos. O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização. Em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas puras pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Além disso, a recuperação do meio reacional pode ser difícil. [140]

Mateo et al. (2007) [141] já consideram que a recuperação e reutilização das enzimas como catalisadores é um processo economicamente praticável e amplamente difundido nos processos de biocatálise industriais. Além do mais, o uso da imobilização simplifica o design de um reator enzimático e o controle da reação. Por isso a idéia de reutilização enzimática depende da estabilidade da preparação com seu reator e esta deve ser alta o suficiente para permitir a exequibilidade adequada do processo. Destaca-se também a importância dos protocolos de imobilização enzimática a serem desenvolvidos a fim de permitir uma melhora nas propriedades enzimáticas até o alcance do objetivo final. [141]

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica. A Figura 9 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas. [140]

Cardoso, Moraes e Cass (2009) [138] salientam que os vários métodos de imobilização empregados baseiam-se nas ligações físicas e químicas entre a

biomolécula e o suporte. Os mais utilizados são: adsorção física (interações hidrofóbicas e de Van der Waals) e química (ligação covalente e iônica), imobilização por confinamento em matriz ou microcápsula e ligação cruzada. A imobilização de enzimas pode ser feita *in batch* ou *in situ*. No processo *in batch*, a enzima é primeiramente imobilizada sobre um suporte e, em seguida, empacotada, por exemplo, numa coluna cromatográfica. Já no processo *in situ*, a enzima é imobilizada diretamente na coluna previamente empacotada. [138]

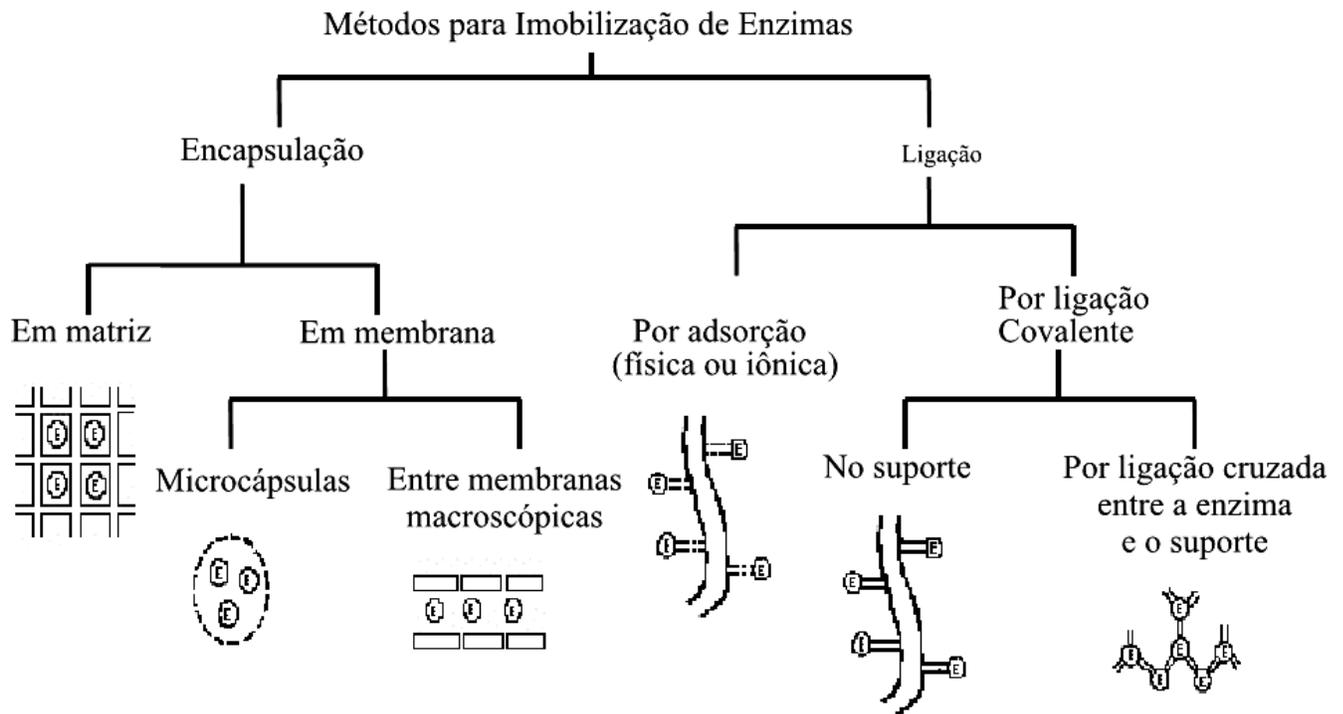


Figura 9: Métodos de imobilização de enzimas.

Fonte: Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi (2004) [140].

Na imobilização por adsorção física a enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel que se encontra em meio aquoso, através de interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas. Tal método promove pouca perturbação sobre a estrutura nativa da enzima. Porém, apresenta como desvantagem a dessorção da enzima durante sua utilização [138, 140]. Na imobilização por adsorção iônica, a enzima se une ao suporte através de atrações eletrostáticas estabelecidas entre as cargas opostas presentes, tanto na superfície do

suporte, quanto da enzima. Essa união é mais efetiva que a adsorção física, mas é inferior quando comparada com outros métodos. [138]

A imobilização por ligação covalente é um dos métodos mais utilizados e envolve a formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos da enzima [(-NH₂) da lisina e arginina, o -CO₂H do ácido aspártico ou glutâmico, a (-OH) da serina ou tionina e o grupo (-SH) da cisteína]. Nesse procedimento estão envolvidas duas etapas químicas: na primeira, os grupos funcionais do suporte (aminoalquila, aminoarila, 3-glicidoxipropil-carboxila, etc.) são ativados por reagentes específicos como, por exemplo, o glutaraldeído (GLU), que introduz um grupo carbonila, susceptível a reações com os grupos nucleofílicos da enzima, segunda etapa do processo (figura 10). [138, 140]

Como vantagens, a imobilização covalente evita o fenômeno de dessorção, a diminuição da velocidade de desativação espontânea, além de aumentar o tempo de vida útil e da estabilidade térmica do biorreator. As ligações covalentes promovem rigidez na estrutura da enzima, limitando seu movimento quando submetida a altas temperaturas. No entanto, apresenta como desvantagem a facilidade em alterar a estrutura terciária nativa da enzima, com subsequente redução da atividade catalítica. [138]

A imobilização de enzimas no interior de uma superfície porosa sólida pode gerar um sistema enzimático com ligações totalmente dispersas e com dificuldades de interação com seus substratos externos. Esse tipo de imobilização em várias oportunidades forma bolhas de gases (originadas por suprimento de alguns inerentes à técnica, forte agitação ou algum método de controle de pH) e estas são responsáveis pela inativação do sistema enzimático. O uso crescente de nano partículas e polímeros recobrando o sistema enzimático imobilizado têm demonstrado grande capacidade das enzimas em interagir com as superfícies externas, inclusive com enzimas imobilizadas em outras partículas. [141]

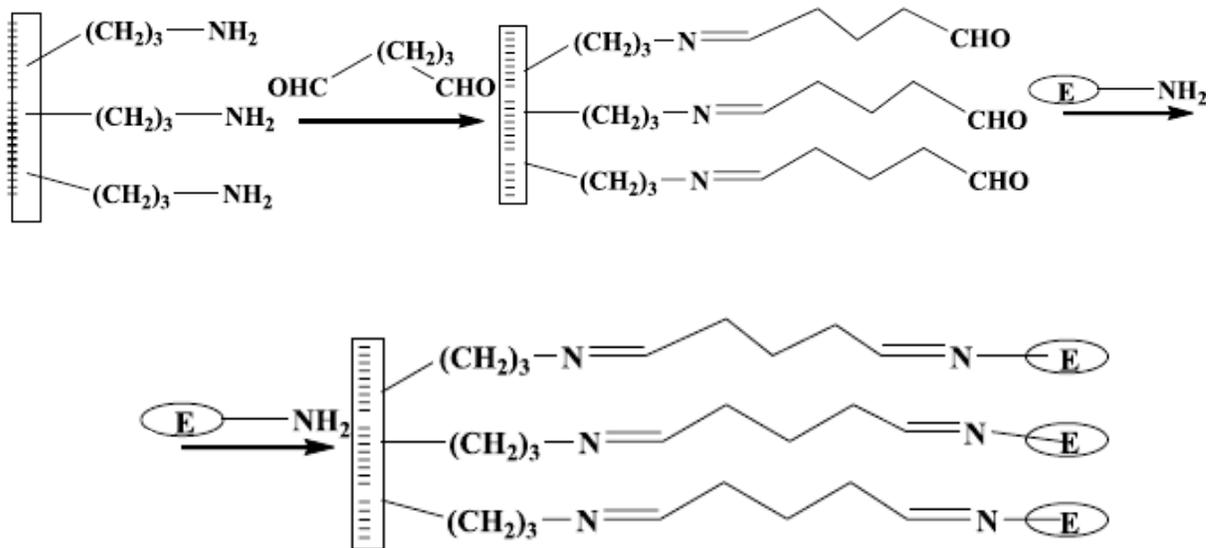


Figura 10: Reação de suportes aminopropilados para imobilização covalente, usando glutaraldeído como agente de ativação.

Fonte: Cardoso, Moraes e Cass (2009) [138].

Na imobilização em matriz de gel, a enzima está livre em solução, mas com seu movimento restrito por uma rede de gel ou polímero. A enzima é misturada aos componentes que formarão o gel e, quando esse é formado, a enzima fica presa à matriz. A imobilização em microcápsula pode ser obtida pelo envolvimento das enzimas por membranas semipermeáveis, ou por micelas reversas formadas por surfactantes. As enzimas permanecem livres em solução, mas em um espaço restrito. [138]

De forma similar Dalla-Vechia, Nascimento e Soldi (2004) [140] dizem que a imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulação consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste sistema cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas como substratos e produtos, se difundem. A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. [140]

A imobilização por ligação cruzada é livre de suporte, e as enzimas estão ligadas umas às outras, ou a proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura tridimensional complexa. Pode ser obtida via métodos físicos ou químicos. Quando obtidas por métodos químicos são resultantes das ligações covalentes entre as enzimas e são favorecidas pelo uso de agentes bi ou multifuncionais. [138]

As características do suporte, grupos reativos e as condições de imobilização devem ser cuidadosamente selecionadas e capazes de envolver o número máximo de grupos enzimáticos comprometidos na imobilização. Relaciona-se estabilização enzimática com o número de ligações enzima-suporte.

O suporte adequado para imobilização enzimática deve cumprir algumas características como: (A) superfície interna grande o suficiente para uma boa congruência geométrica com a enzima, caso a superfície do suporte seja formada por fibras muito finas e menores que as da proteína dificilmente haverá uma forte interação com a enzima; (B) apresentar uma alta densidade superficial relativa em relação aos seus grupos de ligação. Uma grande quantidade de grupos reativos na superfície da proteína permite o alcance de ligações covalentes múltiplas no sistema suporte-enzima; (C) os grupos reativos da enzima devem ter o mínimo de impedimento estérico, porque a formação das ligações covalente múltiplas envolve ligações das enzimas às estruturas rígidas dos grupos relacionados no suporte; (D) os grupos reativos do suporte devem reagir exclusivamente com os localizados na superfície das enzimas; (E) o grupo reativo envolvido na imobilização deve ser estável para permitir um longo período de ligação do sistema enzima-suporte; (F) fácil obtenção de uma superfície inerte final no suporte após a imobilização, ao destruir ou bloquear os restantes grupos reativos na proteína, sem afetar a atividade enzimática. [141]

1.2.4. Parâmetros que influenciam a imobilização enzimática

Embora a formação das ligações covalentes múltiplas dependa da escolha adequada do suporte e do grupo ativador, a seleção de uma condição ideal para imobilização é fundamental para uma boa atividade enzimática. Mateo et al. (2007) destacam algumas dessas variáveis críticas: [141]

- (A) *Tempo de reação*: embora o processo de imobilização seja muito rápido, a interação múltipla em pontos não complementares da enzima e em seus suportes é um processo lento e dependente do tempo. É necessário um correto alinhamento entre os grupos, os já imobilizados e os parcialmente enrijecidos na superfície do suporte;
- (B) *pH*: apesar da maioria das imobilizações acontecer em meio neutro, em muitos casos o processo de imobilização ocorre em meio alcalino, onde a reatividade de nucleófilos das proteínas (e.g.: aminoácido lisina) é melhorada com uma maior atividade no complexo suporte enzimático. Alguns grupos amino terminais tem pKb entre 7 e 8, enquanto da lisina apresenta um valor de 10,5;
- (C) *Temperatura*: temperaturas moderadamente altas podem favorecer as vibrações na enzima e no suporte, aumentando a possibilidade de maiores ligações entre enzima e suporte;
- (D) *Tampões*: não devem interferir na reação. Exemplo: tampão borato pode comprometer a reação entre aldeídos e aminas; compostos aminados (tris, etanolamina) modificam suportes epoxidados ou competem com a lisina por grupos aldeídos;
- (E) *Inibidores ou protetores enzimáticos*: a presença de inibidores ou outros compostos protetores podem reduzir a imobilização covalente múltipla e a atividade enzimática.

Outros trabalhos e publicações descrevem a importância e as vantagens da imobilização enzimática nos diversos campos da química e da medicina. Marconi (1989) [142] mostra uma revisão do comportamento catalítico das enzimas imobilizadas, a cinética das reações catalisadas, as aplicações práticas e suas utilizações na química analítica e na indústria, além das perspectivas de trabalhos futuros. Bertucci et al. (2003) [143] discutem a utilização da HPLC e da eletroforese capilar (CE) como métodos de separação para caracterizar drogas e estudar a afinidade das mesmas na interação com biopolímeros. Suportes sólidos de biopolímeros para a imobilização de enzimas, receptores e proteínas de membrana são inseridos num sistema de HPLC para determinar constantes para ligantes específicos, substratos e inibidores de interesse farmacêutico; permitindo o isolamento e a identificação de drogas ou “candidatos” a drogas provenientes de misturas químicas ou biológicas complexas. O artigo reporta as principais técnicas de imobilização via biopolímeros, destacando um aumento da estabilidade e uma redução no gasto das enzimas durante o processo. As vantagens do método também englobam os testes de recuperação, a reutilização (reciclagem), a reprodutibilidade e o alto rendimento para triagem *on-line* no estudo de ligantes. Finalmente, cita a união promissora da HPLC e CE na análise em microescala de drogas utilizando os parâmetros de imobilização em biopolímeros.

De forma similar, Ma et al. (2009) [144] estudaram os recentes avanços da utilização de reatores enzimáticos e suas aplicações na análise de proteomas, isto é, o resultado da expressão de um conjunto de genes e das modificações pós-traducionais das proteínas produzidas em resposta a condições ambientais definidas. O artigo destaca a elevada taxa reacional do sistema com diversos substratos e as principais contribuições nos últimos 5 anos para o desenvolvimento dos reatores e suas aplicações na análise de proteomas. É revisto neste estudo a evolução dos chamados transportadores inorgânicos e orgânicos para o processo e as vantagens da facilidade de hifenização dos reatores imobilizados com os sistemas de separação e as mais modernas técnicas de identificação. [144, 145]

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

É cada vez maior o apelo da comunidade científica em identificar e quantificar os componentes possivelmente encontrados no mel. A complexidade da matriz é um desafio para os pesquisadores e a determinação de sua composição química tem vários propósitos analíticos além da simples verificação da adulteração ou controle de qualidade do alimento. Outrossim, a identificação de compostos farmacologicamente ativos aumenta com o crescente apelo da medicina em explorar seu potencial como agente antimicrobiano, cicatrizante, antiinflamatório, antioxidante e anticanceroso. Portanto, elucidar a composição química das amostras, correlacioná-las com sua origem geográfica e botânica, além de projetar estes fatores associando-os à atividade terapêutica e antibacteriana são vertentes fundamentais dos trabalhos que envolvam pesquisas com o mel.

A química analítica tem sido de grande importância no controle de processos industriais, no monitoramento ambiental e em diferentes aplicações na medicina e na biotecnologia. O aumento da demanda das análises químicas e a necessidade do desenvolvimento de metodologias rápidas, confiáveis e de baixo custo capazes de fornecer informações sobre a composição de um sistema *on-line* para o monitoramento de espécies químicas têm evoluído de maneira muito acentuada. Nas últimas décadas, poucos temas geraram tanto interesse e agregou tantas áreas distintas como o desenvolvimento de sensores químicos e a química enzimática.

A seletividade das enzimas e a sua capacidade de catalisar reações de substratos com baixas concentrações são de grande uso na análise química. Diversos métodos são descritos na literatura, desde a imobilização na superfície de um eletrodo até a imobilização sobre diferentes substratos, tais como, resinas de troca iônica, por meios químico e/ou físicos, visando diversas aplicações, dentre elas os acoplados aos sistemas de detecção em tempo real. O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos, aumentar a estabilidade em solventes orgânicos e exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, a diminuição de alterações estruturais, especialmente em seu sítio ativo, representa uma condição ímpar ao sistema com a manutenção dos parâmetros enzimáticos por períodos longos de tempo e análise.

Os métodos de análise por injeção em fluxo, em sua forma atual, foram descritos pela primeira vez por Ruzicka e Hansen na Dinamarca e por Stewart e colaboradores nos Estados Unidos na metade dos anos 1970. O processo identificado pela sigla FIA (*Flow Injection Analysis*) teve como mérito desenvolver procedimentos analíticos com alta produtividade, instrumentação de baixo custo, versatilidade, frequência analítica, reprodutibilidade e exatidão nas medidas. A automação e a mínima intervenção do analista acoplada a sistemas de detecção espectrofotométricos e eletroanalíticos proporcionam uma robusta ferramenta para o monitoramento, em tempo real, das espécies químicas provenientes de uma reação enzimática. Em especial, os compostos eletroativos podem ser detectados com base nas suas propriedades elétricas em um sistema de eletrodos conforme a variável a ser determinada (potencial, corrente, concentração e tempo). Dentre estas técnicas podem-se destacar as voltamétricas pela seletividade, rapidez de resposta, alta sensibilidade, facilidade de miniaturização e baixo custo.

Os sensores químicos eletroanalíticos podem responder a mais de uma espécie eletroativa ao mesmo tempo, ocasionando problemas durante a metodologia de identificação ou quantificação de um determinado componente. Por conseguinte, o uso de eletrodos modificados e biossensores associados a métodos de automação de análises constituem em uma poderosa ferramenta para a resolução rápida e confiável de análises de amostras complexas, especialmente o mel.

Modificar um eletrodo consiste em atribuir e controlar novas propriedades físico-químicas, através do acoplamento de espécies químicas ativas (ou não) à sua superfície. Em um eletrodo modificado sua superfície é propositadamente alterada por adsorção, por recobrimento físico, ou pela ligação de espécies específicas. O resultado consiste em bloquear o acesso ao eletrodo, inibindo alguns processos químicos, porém sendo seletivo a outros com propriedades peculiares. A caracterização de eletrodos pode ser efetuada por métodos eletroquímicos, espectroscópicos e microscópicos. Os eletrodos modificados freqüentemente originam correntes mais elevadas do que na ausência do modificador. Este fato é extremamente útil para diversas aplicações como a determinação analítica de espécies como o peróxido de hidrogênio e a eletrocatalise.

Frente a estes comentários e justificativas surgiu à necessidade do desenvolvimento deste trabalho que se apresenta com os principais objetivos:

- Determinar a origem botânica das amostras de mel com base nas técnicas melissopalínológicas;
- Avaliar a imobilização das enzimas peroxidase e catalase em diferentes resinas de troca iônica;
- Elaborar protocolos de condicionamento e utilização enzimática, bem como procedimentos de reaproveitamento dos reatores tubulares e das resinas suportes estudadas para o processo de imobilização;
- Otimizar o sistema de análise por injeção em fluxo associado a reatores tubulares enzimáticos e aos métodos de detecção espectrofotométrica e amperométrica;
- Determinar as concentrações de peróxido de hidrogênio em diferentes amostras comerciais de mel por espectrofotometria e amperometria diferencial;
- Determinar as concentrações de catalase em diferentes amostras comerciais de mel por detecção amperométrica;
- Avaliar o poder antibacteriano das amostras a partir de testes microbiológicos em difusão em ágar e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima bacteriostática ou bactericida de cada amostra;
- Correlacionar os teores de peróxido de hidrogênio e catalase com a origem geográfica e botânica das amostras e os resultados das avaliações microbiológicas das amostras.

**Capítulo 3. ANÁLISE
PALINOLÓGICA DAS
AMOSTRAS DE MEL
(MELISSOPALINOLOGIA)**

3.1. INTRODUÇÃO

O uso da palinologia em vários ramos da ciência só é possível devido a grande variabilidade morfológica encontrada nos grãos de pólen, que permite caracterizar famílias, gêneros e espécies. Essas características, estabelecidas geneticamente, não estão sujeitas às variações das condições ambientais, o que as torna, em geral, bastante estáveis e de grande valor diagnóstico, com aplicação mais ampla na taxonomia. Na prática, entre outras aplicações, a análise do conteúdo polínico do mel vem sendo usada para diagnosticar sua origem botânica, sua qualidade como alimento, bem como o valor das plantas fornecedoras de néctar ou pólen e possíveis adulterações desse produto. [29]

Barth (1989) [22] relacionou a análise polínica quantitativa das amostras de mel com a contribuição nectarífera percentual das espécies apícolas na formação do mel, a qual fica também na dependência da constituição da flor (maior ou menor afastamento entre anteras e nectários, anteras estéreis, etc.) bem como do grau de maturação da amostra, pois o mel ainda verde conterá um número menor de grãos de pólen do que o maduro. Conhecendo-se as percentagens reais de grãos de pólen em méis monoflorais, isto é, provenientes de uma única espécie botânica, ter-se-á valiosos dados para a elucidação deste problema quantitativo na composição de méis não monoflorais. O ideal seria a elaboração de constantes relacionando o número de grãos de pólen com a quantidade de néctar fornecido para cada espécie vegetal melífera.

Considerando-se méis de diferentes regiões geográficas e florísticas do Brasil, a análise polínica qualitativa pode fornecer importantes dados, primeiramente para a caracterização dos méis quanto à sua origem botânica e regional e de sua época de coleta e posteriormente quanto à determinação do mel de origem desconhecida ou duvidosa, bem como possíveis fontes de contaminações, falsificações e misturas que possam comprometer a qualidade e o valor nutritivo do alimento. [22]

Em termos quantitativos o número de grãos de pólen nas amostras de mel varia muito segundo as espécies vegetais e o método de obtenção do mel. Em méis centrifugados normalmente fica entre 20.000 e 100.000 grãos por 10 g de mel. [22, 31]

Jones e Bryant Júnior (1996) [146] determinam uma contagem mínima de 1500 grãos de pólen por amostra (500 para cada lâmina) para atribuir a classificação palinológica. Na avaliação porcentual, atribuiu-se o valor de 100% ao total de grãos de pólen contado por amostra, sendo que o pólen de cada espécie, ou cada tipo polínico, ocupa uma porção deste total expresso em porcentagem.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico em água desionizada Mili-Q (resistividade maior que 18 MΩ cm). Gelatina branca em pó, glicerina e fenol foram obtidas da Reagen-Quimibrás[®] Indústrias Químicas S/A para o preparo da gelatina glicerinada. Álcool absoluto, acetona, éter P.A. e parafina da Vetec[®] Química Fina Ltda e usados para a remoção de substâncias oleaginosas e selagem das lâminas, respectivamente. As lâminas para microscopia marca Solidor[®], foram adquiridas e importadas pela Lamedid Comercial e Serviços Ltda.

3.2.2. Instrumentação

Balança analítica AND HR-120 (Max 120 g e d=0,1 mg) e banho ultratermostático da Cientec[®], Piracicaba (SP) para pesagem dos reagentes e controle da temperatura durante o preparo das soluções para a montagem das lâminas microscópicas. Centrífuga para Tubos - Q222T, da Quimis[®] Aparelhos Científicos e Microscópio óptico de luz Olympus[®] (BX-41), com câmera de exposição automática para obtenção das fotomicrografias das lâminas investigadas.

3.2.3. Amostras

Neste trabalho foram escolhidas, de maneira aleatória, 17 amostras de mel adquiridas no comércio nacional e internacional. Destas, 14 eram de procedência nacional e 3 estrangeiras. A origem geográfica dos exemplares está ilustrada na figura 11. Em destaque, no canto direito superior, as amostras originárias de diversos municípios brasileiros.



Figura 11: Origem geográfica das amostras de mel utilizadas na pesquisa.

Fonte: adaptado de Google Maps (2010) [147].

A tabela 7 resume todas as 17 amostras mel comerciais utilizadas na pesquisa, com sua origem geográfica e botânica (nomenclatura informada pelo fabricante).

Tabela 7: Nome comercial, origem botânica e geográfica das amostras analisadas na pesquisa, informados pelos fornecedores dos méis.

Amostra	Nome Comercial e/ou Origem Botânica	Origem Geográfica
1	<i>Manuka +5</i>	<i>Motupiko (Nova Zelândia)</i>
2	<i>Laranjeira</i>	<i>Shizuoka-Ken (Japão)</i>
3	<i>Rengue</i>	<i>Shizuoka-Ken (Japão)</i>
4	<i>Cassutinga</i>	<i>Feira de Santana (Bahia)</i>
5	<i>Velame</i>	<i>Santa Bárbara (Minas Gerais)</i>
6	<i>Morrão de Candeia</i>	<i>Teresópolis (Rio de Janeiro)</i>
7	<i>Bracatinga</i>	<i>Teresópolis (Rio de Janeiro)</i>
8	<i>Cipó-Uva</i>	<i>Teresópolis (Rio de Janeiro)</i>
9	<i>Laranjeira</i>	<i>Teresópolis (Rio de Janeiro)</i>
10	<i>Laranjeira</i>	<i>Juiz de Fora (Minas Gerais)</i>
11	<i>Assa-Peixe</i>	<i>Teresópolis (Rio de Janeiro)</i>
12	<i>Assa-Peixe</i>	<i>Juiz de Fora (Minas Gerais)</i>
13	<i>Silvestre (Multifloral)</i>	<i>Teresópolis (Rio de Janeiro)</i>
14	<i>Silvestre (Multifloral)</i>	<i>Viçosa (Minas Gerais)</i>
15	<i>Eucalipto</i>	<i>Teresópolis (Rio de Janeiro)</i>
16	<i>Eucalipto</i>	<i>Juiz de Fora (Minas Gerais)</i>
17	<i>Mel de Abelha Jataí (Tetragonisca angustula)</i>	<i>Campinas (São Paulo)</i>

3.2.4. Metodologia Analítica

A determinação da coloração das amostras foi à mesma estabelecida por Zander et al. (1975) [31], onde padronizaram a nomenclatura da cor do mel com correspondência à escala clássica estabelecida por Pfund no *Pfund-Color-Grader* em: branco-água, extra-branco, branco, âmbar extra-claro, âmbar-claro, âmbar, âmbar-escuro. [22, 31]

A metodologia de preparo da gelatina glicerinada foi semelhante ao descrito por Barth (1989) [22]. Dissolveram-se 7 g de gelatina branca em pó em 24,5 mL de água destilada, deixando-se inicialmente 1 hora em repouso, visando o intumescimento da gelatina; aqueceu-se em seguida em banho-maria, cuja temperatura não ultrapassou 50°C, até a dissolução completa da gelatina. Adicionaram-se 21,0 mL de glicerina a 82% (em água) e 1 g de cristais de fenol para evitar mofo. A gelatina glicerinada foi condicionada em recipientes bem fechados na geladeira.

A preparação de algumas lâminas de grãos de pólen de referência foi feita de maneira semelhante às amostras de mel, isto é, foram incluídos também em gelatina glicerinada, após lavagem em álcool absoluto, acetona ou éter, a fim de eliminar as substâncias oleaginosas que às vezes envolvem em excesso os grãos de pólen. Adicionalmente à preparação das lâminas, a descrição da morfologia do pólen representativo dos tipos polínicos encontrados nas amostras foi confrontada com glossários ilustrados e catálogos de referências especializadas. [22, 29, 148]

O procedimento de preparo das lâminas das amostras de mel foi feito de maneira semelhante ao padronizado por Louveaux, Maurizio e Vorwohl (1970) [25] e realizado no laboratório do Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Inicialmente, dissolveram-se cerca de 10 g de mel em 20 mL de água desionizada morna (40 °C) com posterior agitação com um bastão de vidro. Colocou-se a solução em uma centrífuga por 15 minutos a 2500 rpm para decantar o sobrenadante. Agitou-se o sedimento com outro bastão de vidro e transferiu-se uma gota do mesmo para uma lâmina, a qual foi submetida à secagem em

chama de um bico de Bunsen. Posteriormente, a lâmina foi montada e selada, respectivamente, com gelatina glicerinada e parafina.

Para as amostras foram preparadas três lâminas com a contagem mínima de 500 pólenes cada e fotografadas com auxílio de uma câmera fotográfica acoplada a um microscópio óptico de luz. A análise qualitativa e o teor percentual quantitativo das lâminas, para a classificação botânica das amostras, seguiram-se conforme descritos por Louveaux, Maurizio e Vorwohl (1970) [25] e Barth (1989) [22].

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As amostras de mel obtidas encontravam-se geralmente em estado viscoso, e não cristalizadas. As cores variavam de acordo com a sua origem. Segundo sua procedência botânica e idade, os méis apresentaram cores variadas, desde o transparente como branco-água até âmbar-escuro. Quanto ao aroma e perfume, a caracterização dos méis foi inteiramente subjetiva, não havendo uma padronização da terminologia empregada. De um modo geral todas as amostras apresentavam sabor e odor agradáveis.

A tabela 8 demonstra o resultado obtido através da análise palinológica para a contagem microscópica das 17 amostras investigadas de mel. Já a figura 12 ilustra as fotomicrografias (aumento de 400 a 1000x) e variabilidade polínica de alguns exemplares estudados. A análise microscópica da amostra 5 (Velame) foi dificultada pela presença de substâncias oleaginosas e os polens agrupados, impedindo a visualização do mesmo em mássula ou isolado. O resultado para a amostra 5 não foi conclusivo e mesmo com a presença polínica de outras espécies, não se pode questionar o rótulo comercial, visto que a amostra citada tem origem nectarífera.

Tabela 8: Resultado da análise palinológica para investigação microscópica das 17 amostras de mel.

Amostra	Resultado Análise Palinológica
1	<i>Confere com o indicado: predominância de grãos de pólen de <i>Leptospermum</i> (família <i>Myrtaceae</i>)</i>
2	<i>Confere com o indicado: predominância de grãos de pólen de <i>Citrus</i> sp.</i>
3	<i>Confere com o indicado: predominância de grãos de pólen de <i>Astragalus</i> (família <i>Fabaceae</i>)</i>
4	<i>Confere com o indicado: ocorrência de grãos de pólen tipo <i>Croton</i> (família <i>Euphorbiaceae</i>)</i>
5	<i>O tipo polínico indicado se refere a uma espécie nectarífica, que apresenta grãos de pólen agrupados. A análise palinológica não permitiu a visualização de pólen em mássula, e a amostra possui uma pequena quantidade de grãos de pólen de outros tipos. Este resultado não permite questionar a indicação do rótulo, uma vez que a planta é nectarífica</i>
6	<i>Confere com o indicado: ocorrência de grãos de pólen tipo <i>Croton</i> (família <i>Euphorbiaceae</i>)</i>
7	<i>Confere com o indicado: ocorrência de grãos de pólen de <i>Mimosa</i> sp.</i>
8	<i>Confere com o indicado: ocorrência de grãos de pólen tipo <i>Serjania</i> (família <i>Sapindaceae</i>)</i>
9	<i>Confere com o indicado: predominância de grãos de pólen de <i>Citrus</i> sp.</i>
10	<i>Confere com o indicado: predominância de grãos de pólen de <i>Citrus</i> sp.</i>

Tabela 8: continuação.

Amostra	Resultado Análise Palinológica
11	<i>Não há predominância de um tipo polínico, origem silvestre (multifloral) é mais característica para a amostra</i>
12	<i>Há predominância de grãos de pólen de Eucalyptus sp. na amostra. Classificação mais coerente para mel de Eucalipto</i>
13	<i>Apesar do número de grãos de pólen de Eucalyptus sp. confere com a indicação de mel Silvestre</i>
14	<i>Confere com a indicação de mel Silvestre</i>
15	<i>Confere com o indicado: predominância de grãos de pólen de Eucalyptus sp.</i>
16	<i>Confere com o indicado: predominância de grãos de pólen de Eucalyptus sp.</i>
17	<i>Não há predominância de um tipo polínico na amostra Classificação mais coerente para amostra é de origem Silvestre</i>

As amostras 11 e 12, Assa-Peixe Teresópolis e Juiz de Fora, respectivamente, foram às únicas em que houve divergências de informação comercial e análise palinológica. Destacou-se que foi encontrado nestas lâminas pólenes característicos do gênero *Vermonia* (*Asteraceae*), entretanto a representação da espécie polínica não foi suficiente para permitir a classificação da amostra como mel de Assa-Peixe. O mel de Abelha Jataí, amostra 17, refere-se não à origem floral e sim à abelha produtora do mel, *Tetragonisca angustula*, e o resultado da melissopalínologia não revelou predominância polínica monofloral. Portanto sua classificação com base no analisado para as lâminas microscópicas foi para mel Silvestre ou Multifloral. Os demais resultados conferem com o relatado pelos produtores e comerciantes das amostras.

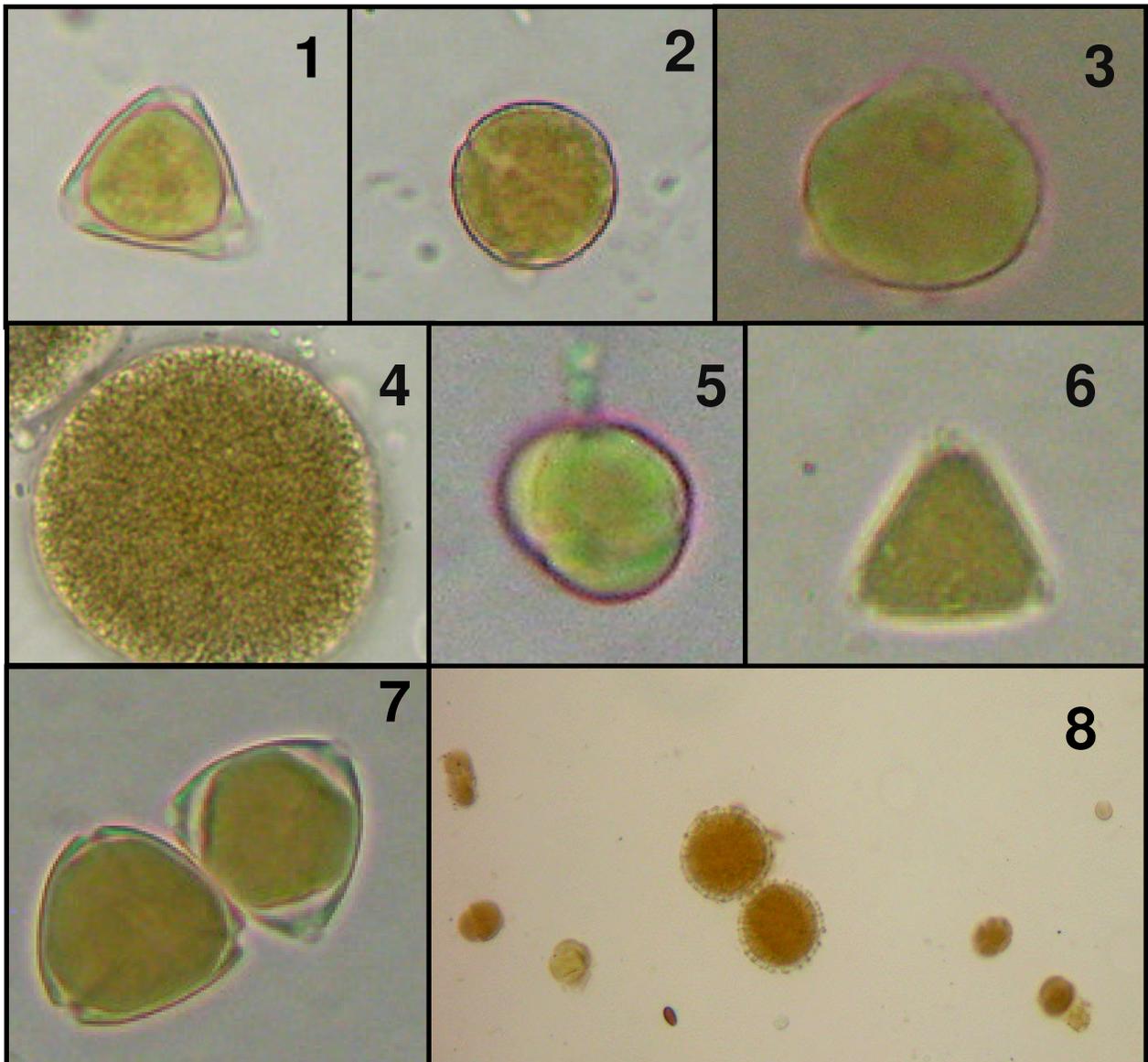


Figura 12: Fotomicrografia dos grãos de pólen encontrados na análise palinológica das 17 amostras de mel (aumento de 400 a 1000x). (1) *Leptospermum*, (2) *Citrus*, (3) *Astragalus*, (4) *Croton*, (5) *Mimosa*, (6) *Serjania*, (7) *Eucalyptus* e (8) Lâmina típica de uma amostra Multuifloral ou Silvestre.

3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nas análises palinológicas, concluiu-se que nenhum dos méis adquiridos comercialmente apresentava características adulteradas, falsificadas ou de melato, revelando a boa procedência das amostras. É comum verificar algumas divergências entre o informado comercialmente e o revelado nas lâminas microscópicas. Fatores como a grande variabilidade polínica, dificuldade no controle migratório das abelhas, falta de conhecimento da espécie floral pelo apicultor, a diversidade e a larga extensão entre as regiões florísticas no Brasil, períodos de floração menos prolongada (e.g. Assa-Peixe), baixa intensidade da produção nectarífera e a ausência de constantes específicas para a correlação das prováveis porcentagens do néctar, como também para os pólenes dominantes e acessórios dificultam a determinação da procedência geográfica e botânica das amostras, bem como a generalização dos resultados.

Os resultados microscópicos estabeleceram um perfil entre origem geográfica e botânica das amostras e as concentrações de H_2O_2 e catalase quantificados no decorrer deste trabalho, além de avaliar as atividades antibacterianas de acordo com os testes de difusão em ágar e diluição em caldo descritos ao final deste trabalho.

**Capítulo 4. DETERMINAÇÃO
ESPECTROFOTOMÉTRICA DE
PEROXIDO DE HIDROGÊNIO EM
AMOSTRAS DE MEL**

4.1. INTRODUÇÃO

Responsável pela maior atividade antibacteriana no mel o peróxido de hidrogênio é gerado enzimaticamente, junto com o ácido glucônico, através da oxidação da glicose pela glicose oxidase (figura 5) presente no mel. O H_2O_2 é um dos agentes oxidantes mais versáteis que existe, além de metabólito natural onde é decomposto em oxigênio molecular e água. Na área ambiental é reconhecido como oxidante mais eficiente na transformação de SO_2 em SO_4^{2-} na fase aquosa da atmosfera, um dos maiores responsáveis pela acidez das chuvas. Acredita-se também que as descargas elétricas contribuam para incrementar a sua concentração. Na área médica a presença de H_2O_2 tem grande importância, pois sua presença deve ser monitorada para se evitar que as células sofram o chamado *stress* oxidativo. O peróxido de hidrogênio é também importante nas áreas envolvidas com alimentos, medicamentos, monitoramento de processos, dentre outras. Está presente em inúmeras reações biológicas como principal produto de várias oxidases, e é um parâmetro importante na quantificação destes bioprocessos. [149]

Vários métodos ilustram a determinação do H_2O_2 . Matos (2001) [150] descreveu um sistema em injeção em fluxo com determinação amperométrica diferencial de H_2O_2 em água de chuva usando catalase imobilizada em reator tubular [150, 151]. Oliveira et al. (2005) [152] fizeram a determinação indireta da glicose presente em diversas amostras de sangue usando a espectrofotometria como método de detecção. A oxidação seletiva da β -D-glicose à D-gluconato leva a produção de H_2O_2 usando um reator tubular contendo a enzima glicose oxidase imobilizada na resina Amberlite IRA-743. O H_2O_2 gerado é estequiometricamente proporcional ao teor de β -D-glicose, e na presença de fenol, 4-aminoantipirina e peroxidase produzem um composto vermelho (antipirilquinonimina) que pode ser determinado no comprimento de onda de 510 nm. O trabalho mostrou a potencialidade da espectrofotometria na detecção de glicose em amostras de sangue, verificou-se boa sensibilidade em amostras com volumes e concentrações baixas. Reprodutibilidade e resultados equiparados aos métodos clássicos também foram observados [152]. De forma semelhante ao trabalho anterior,

Silva et al. (2009) [153] fizeram a determinação da glicose em amostras de mel, porém, o H_2O_2 gerado é monitorado via amperometria conforme parâmetros desenvolvidos nos trabalhos com a água de chuva [153]. No mel, Manzoori, Amjadi e Orooji [154], determinaram o H_2O_2 em amostras iranianas por espectrofluorimetria e obtenção da enzima peroxidase a partir de extratos crus de Kohlrabi (*Brassica oleracea gongylodes*). Outros métodos podem ser destacados como volumetria, quimiluminescência, algumas vezes com o emprego de fibra óptica, cromatografia e por métodos eletroquímicos. [149]

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico. Peróxido de hidrogênio 29-32% e fenol foram obtidos da Reagen-Quimibrás[®] Industrias Químicas S/A, fosfato de sódio monobásico anidro P.A. da Synth[®] – Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, fosfato de sódio bibásico anidro P.A. - USP da Nuclear[®] – Casa da Química. Glutaraldeído P.A. solução 25% em H_2O da Vetec[®] Química Fina Ltda, Resinas Amberlite IRA-743, IRA-400 e IRA-120, D (+) Glicose, D (+) Frutose e 4-Aminoantipirina da Sigma Aldrich[®] (St. Louis, MO, USA). Peroxidase EC 1.11.1.7 (horseradish 115 U mg^{-1}) da Seppim[®], França sendo estocada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Tampões Merck[®] pH 4,01 e 7,00, solução eletrolítica de KCl a $3,0\text{ mol L}^{-1}$ da WTW D-82362 Weilheim, Germany foram usadas para calibração e armazenamento do pHmetro, respectivamente.

A solução tampão pH 7,40 fosfato de sódio monobásico-dibásico $0,1\text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em água desionizada Milli-Q (resistividade maior que $18\text{ M}\Omega\text{ cm}$) e usada para o preparo das soluções de 4-aminoantipirina ($3,0\text{ mmol L}^{-1}$), de fenol (17 mmol L^{-1}) e de H_2O_2 (10 mmol L^{-1}). Uma série de padrões de H_2O_2 com concentrações na faixa de

1,0 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram preparados a partir da diluição da solução estoque momentos antes de serem utilizadas.

4.2.2. Instrumentação

Um espectrofotômetro duplo feixe (U.V. 1601 PC) Shimadzu[®] (figura 13), com cubetas de vidro e quartzo (caminho óptico 1,00 cm) foi usado para registrar o espectro de máxima absorção do complexo antipirilquinonimina e realizar as medidas espectrofotométricas do H_2O_2 .



Figura 13: Espectrofotômetro Shimadzu[®] UV 1601 PC.

Banho Ultratermostático da Cientec[®], Piracicaba (SP) foi usado para o controle das temperaturas nos testes de estabilidade enzimática e formação do complexo colorido antipirilquinonimina. Estufa Modelo 315-E da Fanem[®], São Paulo (SP) para secagem da resina Amberlite IRA-743 à 100 °C e uma balança analítica AND HR-120 (Max 120g e d=0,1 mg) para pesagem dos reagentes foram usados neste trabalho. A medida do pH da solução tampão foi feita utilizando-se um potenciômetro da Digimed DM 20 com eletrodo de vidro (Metrohm) combinado com eletrodo de referência de $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$ calibrado com soluções tampão Merck[®] de pH 4,01 e pH 7,00. Para o tratamento estatístico dos dados foram utilizados os programas Microcal Origin 7.0 e Microsoft Office Excel 2003.

4.2.3. Imobilização Enzimática e Construção dos Reatores Tubulares

A seletividade das enzimas e sua capacidade de catalisar as reações com substratos em baixas concentrações são largamente utilizadas na análise química. Diversos métodos são descritos na literatura para a imobilização de enzimas associados aos métodos de injeção em fluxo com detecção amperométrica ou espectrofotométrica, onde na maioria das vezes a enzima é imobilizada na superfície de um eletrodo por meios físicos ou químicos ou em reatores tubulares. A determinação de H_2O_2 envolveu o desenvolvimento de um reator tubular usando a enzima peroxidase imobilizada com o auxílio de um agente ativador glutaraldeído sobre uma resina de troca iônica (suporte) em metodologia semelhante proposta por Matos et al. (2001, 2005 e 2009). Cabe destacar que tais reatores foram preparados em cerca de 30 minutos, contrastando com a maioria dos trabalhos que requerem muitas horas ou até mesmo dias para realizar a imobilização enzimática. Os reatores foram construídos visando sua utilização para análises *on-line* de H_2O_2 em padrões e amostras comerciais de mel. [150-153]

A figura 14 mostra um diagrama esquemático da imobilização enzimática. A resina Amberlite IRA-743 (250 mg), escolhida como suporte, foi inicialmente tratada com 100 μ L de glutaraldeído 0,1 % (IRA - GLU), por 5 minutos, sob constante agitação, depois foram adicionados 690 UI (6 mg) de peroxidase (IRA - GLU - POD) deixando em contato por 10 minutos, sob agitação magnética para favorecer a interação GLU - POD. A construção dos reatores tubulares foi um processo bem simples e consistiu na introdução do sistema Amberlite IRA-743 / GLU / POD, com auxílio de uma seringa comercial de 5 mL de polietileno, em tubos cilíndricos de teflon[®] com 2,2 cm de comprimento e 0,26 cm de diâmetro interno (figura 15). Às extremidades, 2 pequenos pedaços de algodão foram colocados para evitar a perda do material imobilizado deixando um espaço de cerca de 0,3 cm para posterior acoplamento ao sistema FIA.

Os reatores foram lavados com solução tampão fosfato (pH 7,40) para retirar possíveis excessos de reagentes. Depois de preparados eles apresentaram alta estabilidade, uma vez que foram utilizados intensamente durante 15 dias consecutivos,

ocasionando uma pequena perda da atividade enzimática. Quando os reatores não estiveram sendo usados eles foram armazenados em *freezer* sob uma temperatura de -20 °C.

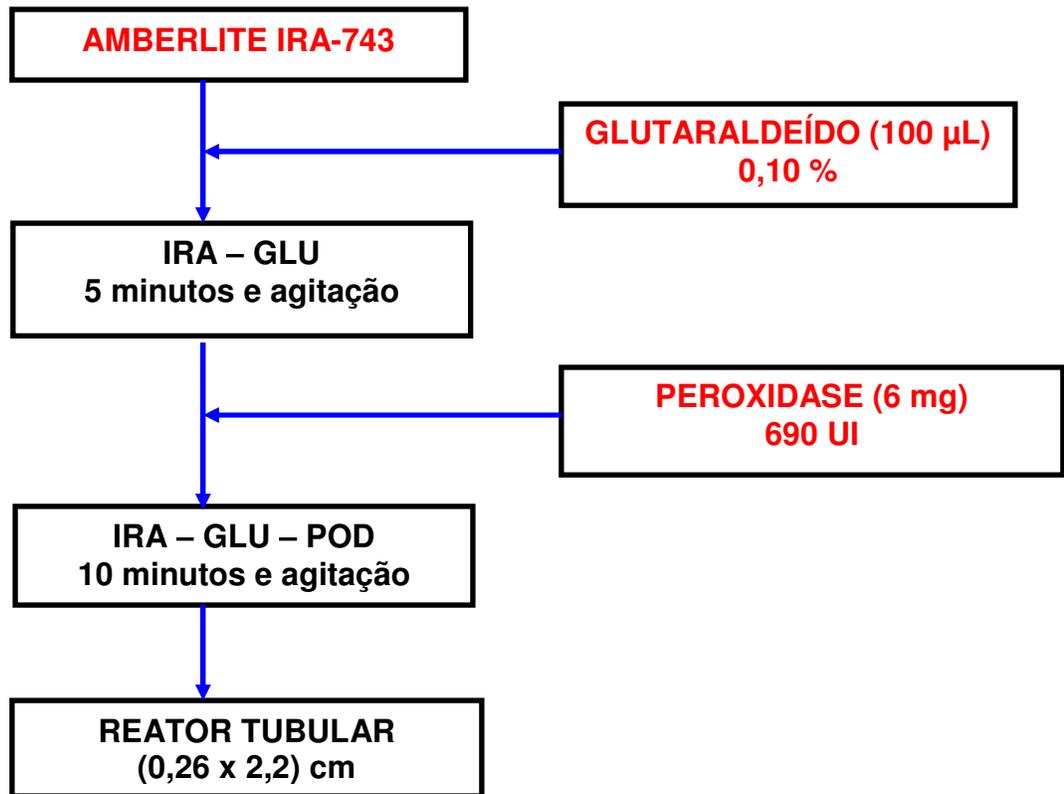


Figura 14: Diagrama esquemático para a imobilização da peroxidase sobre a resina de troca iônica. IRA: Amberlite IRA-743, GLU: glutaraldeído e POD: peroxidase.

processo de imobilização enzimática. A mesma metodologia descrita neste item foi utilizada para a montagem dos reatores tubulares na determinação amperométrica diferencial do H_2O_2 em amostras de mel (capítulo 5).

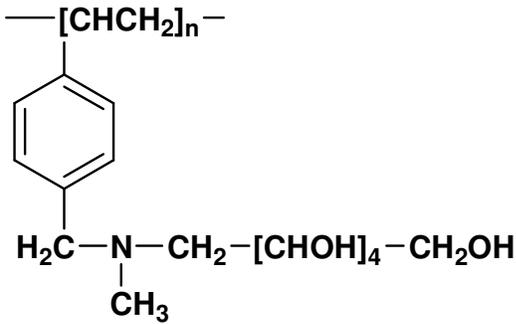


Figura 17: Estrutura poliestirênica e grupo funcional metilglucamina da resina aniônica Amberlite IRA-743.

4.2.4. Sistema de Injeção em Fluxo Associado aos Reatores Tubulares com Detecção Espectrofotométrica

Um dos campos mais promissores nas determinações enzimáticas é a associação das enzimas imobilizadas presentes em reatores aos sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) ao longo do percurso analítico. Além de apresentar um ótimo desempenho, utiliza-se apenas uma pequena quantidade de massa da enzima, o que é muito importante, considerando o elevado custo do material [155-159]. Matos et al. [150-153] em várias oportunidades descreveram a aplicação do FIA na imobilização enzimática, inclusive na determinação de H_2O_2 proveniente de diversas matrizes.

Para a determinação espectrofotométrica de H_2O_2 nas amostras de mel, foi utilizado um sistema FIA monocanal, constituído basicamente por um injetor, um reator enzimático e um detector. Para contornar as limitações impostas pelo uso de bombas peristálticas e/ou reduzir o custo fez-se uso de mini-compressores de ar para a propulsão do eletrólito carreador, originalmente destinados ao borbulhamento de ar em aquários domésticos. Trata-se de uma alternativa versátil, de baixo custo, (R\$ 20,00 a 30,00), que permitiu ajuste contínuo da vazão sempre com a vantagem da ausência de

pulsção do fluido propelido. As soluções e reagentes foram propelidas por pressurização utilizando uma bomba de aquário da marca *Hobby 14* (figura 18).



Figura 18: Mini-compressor tipo “bomba de aquário” utilizado para propelir as soluções e reagentes durante a análise em fluxo.

O controle do fluxo foi feito com o auxílio de uma válvula que pressiona um tubo de Tygon[®] colocado na linha. Tubos de Teflon[®] de 0,5 mm de diâmetro interno foram usados para montar o sistema. O diagrama esquemático da adaptação dos mini-compressores de ar e da válvula reguladora de vazão foi o mesmo descrito por Matos et al. (2001) [150, 160]. A injeção da amostra foi realizada com auxílio de um injetor comutador constituído por 3 peças de acrílico (figura 19), semelhante ao desenvolvido por Reis (1998) [155]. O reservatório de eletrólito de suporte foi conectado ao regulador de vazão seguido do injetor anteriormente descrito, provido de alça de amostragem com volumes variáveis entre 50 e 250 μL . Tubulação de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno serviu para interligar o reservatório com o injetor (30 a 40 cm de extensão) ao reator tubular enzimático e balão volumétrico para posterior análise espectrofotométrica.

A representação esquemática do sistema em fluxo (diagrama de fluxo) para a determinação dos teores de H_2O_2 nas amostras de mel, por espectrofotometria está ilustrada na figura 20. Os registros de absorbância não foram realizados de maneira *on-line*, onde a coleta do produto reacional foi feita em balões volumétricos de 10,00 mL, previamente preenchidos com fenol e 4-aminoantipirina, para posterior leitura em espectrofotômetro.



Figura 19: Injetor comutador utilizado no sistema FIA para a determinação espectrofotométrica de H_2O_2 nas amostras de mel.

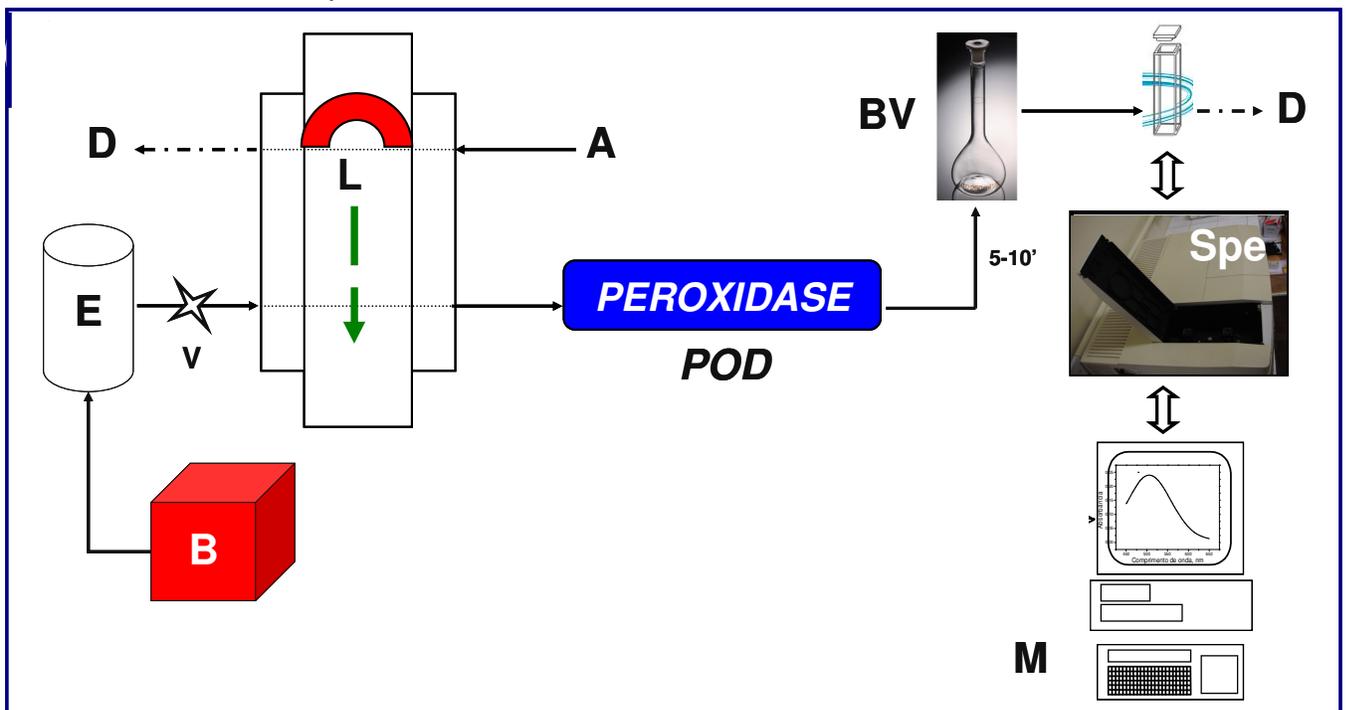


Figura 20: Diagrama esquemático do sistema FIA empregado para a análise de peróxido de hidrogênio. A: amostra; B: bomba de aquário; E: eletrólito (solução tampão fosfato pH 7,4); V: válvula de controle do fluxo, L: *loop* ou alça de amostragem, POD: enzima peroxidase imobilizada em reator tubular; M: microcomputador e D: descarte. Na determinação espectrofotométrica a reação se processa num balão volumétrico (BV) entre 5-10' para posterior leitura no espectrofotômetro (Spe) λ_{max} 510 nm.

4.2.5. Metodologia Analítica

A metodologia é uma adaptação do trabalho desenvolvido por Nicell e Wright (1997) [161] no qual os pesquisadores estudaram modelos cinéticos enzimáticos para mensurar a concentração e a atividade de enzimas no tratamento de águas contaminadas por compostos aromáticos, em especial a peroxidase (peróxido de hidrogênio oxidorreductase, EC 1.11.1.7). A enzima peroxidase catalisa a oxidação de compostos aromáticos em meio aquoso na presença do H_2O_2 , em uma série de eventos seqüenciais que envolvem a formação de radicais livres até a reação final com um substrato cromógeno, gerando um composto cuja intensidade da cor é proporcional à atividade enzimática e a concentração de peróxido no meio. Padronizando parâmetros como pH, temperatura, concentração dos substratos e fixando a quantidade de enzima utilizada foi possível determinar o teor do H_2O_2 conforme modelo proposto pelo trabalho. [161]

A reação inicia com a oxidação do fenol (PhOH) catalisada pela peroxidase (POD) e H_2O_2 com a produção do radical livre fenoxi ($PhO\cdot$). A sequência dos eventos envolvidos pode ser descrita pelo mecanismo de Chance-George [161] (figura 21):

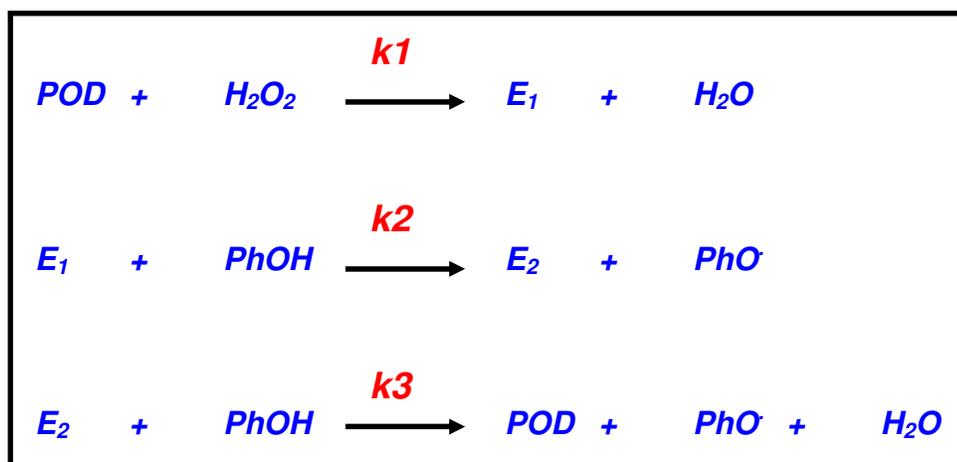


Figura 21: Mecanismo de Chance-George.

A enzima peroxidase (POD) é oxidada pelo H_2O_2 a um intermediário ativo enzimático chamado de E_1 . Este composto aceita o fenol (PhOH) em seu sítio ativo e conduz sua oxidação. O radical livre fenoxi (PhO^\cdot) é produzido e liberado na solução junto com um composto E_2 que oxida uma segunda molécula de fenol, liberando outro radical livre e retornando a enzima no seu estado natural (POD), completando o ciclo. A geração da cor resulta da reação dos radicais fenoxi com a 4-aminoantipirina (Am-NH_2) e o H_2O_2 gerando a anti-pirilquinonimina (APQ), como está descrito na figura 22. O composto de coloração vermelha e absorvidade molar (ϵ) $7210 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ tem pico máximo de absorção em 510 nm de comprimento de onda (λ_{Max}) - figura 23. [161]

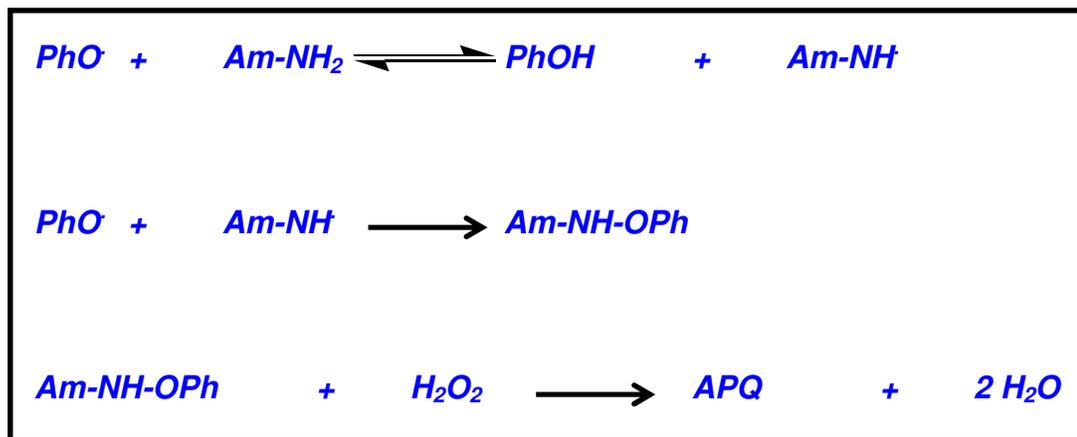


Figura 22: Mecanismo de formação da anti-pirilquinonimina.

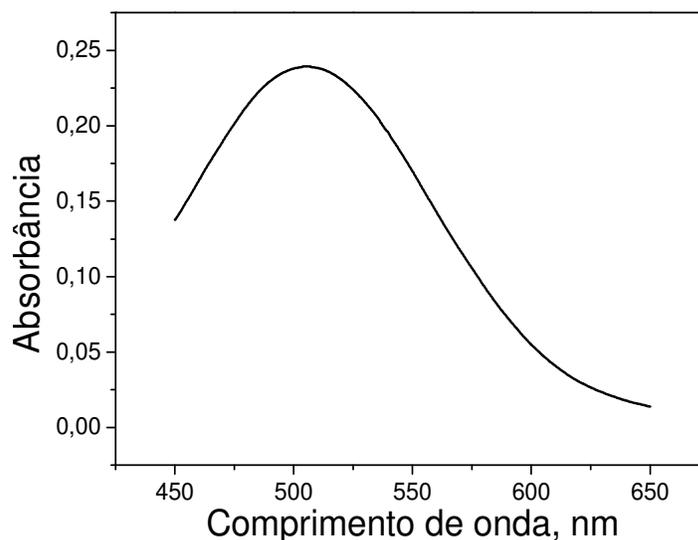


Figura 23: Exemplo de espectro de absorção do complexo anti-pirilquinonimina gerado na determinação de H_2O_2 .

A geração da cor pela reação do fenol, 4-aminoantipirina e peróxido de hidrogênio, catalisada pela enzima peroxidase pode ser representada pela seguinte reação global (figura 24) e proporcional à concentração de H_2O_2 [161]:

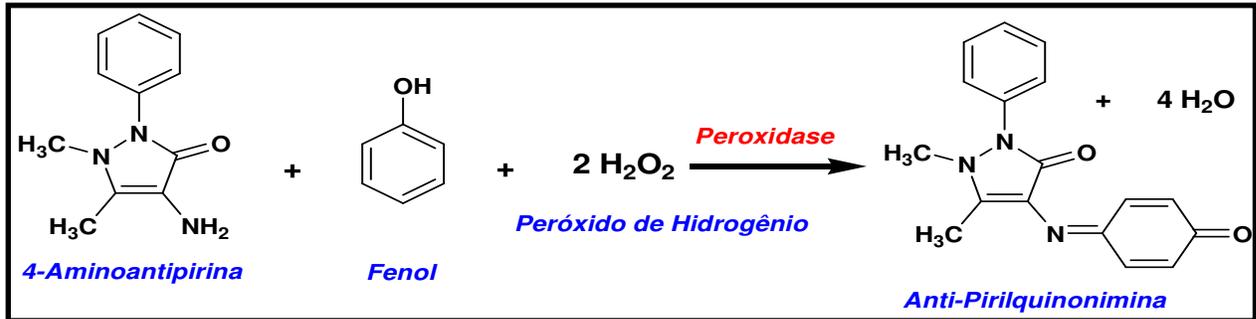


Figura 24: Reação global da formação da anti-pirilquinonimina

A determinação indireta de glicose e ácido úrico na urina foi descrita por Matos et al. (2001) [150] com aplicação da metodologia em amostras de interesse biológico. A glicose é oxidada a ácido glucônico (ou gluconato) pela glicose oxidase, enquanto o ácido úrico em alantoína pela enzima uricase. Em ambos os casos o H_2O_2 gerado no meio reacional é submetido à metodologia descrita anteriormente. O composto colorido anti-pirilquinonimina formado é proporcional ao teor de H_2O_2 e conseqüentemente aos analitos de interesse biológico [150]. O mesmo princípio foi utilizado na determinação de glicose por Oliveira et al. (2005) [152], porém em amostras de sangue.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.1. Estudo da Concentração de Fenol, 4-Aminoantipirina e Peroxidase

Para este estudo, diferentes concentrações de fenol e 4-aminoantipirina, que variaram de 0 a 2,55 mmol L⁻¹ e de 0 a 0,45 mmol L⁻¹, respectivamente, foram avaliadas. Todas as soluções estoque foram preparadas em balões volumétricos de 10,00 mL. No teste para o fenol 1,00 mL de 4-aminoantipirina (3 mmol L⁻¹) foi adicionado ao balão volumétrico reacional final para verificação do composto colorido anti-pirilquinonimina; enquanto para o estudo da 4-aminoantipirina 0,75 mL de fenol (17 mmol L⁻¹) foram escolhidos para o mesmo procedimento. Solução padrão de H₂O₂ 1,0 mmol L⁻¹ com volume de injeção de 200 µL e uma solução eletrolítica carreadora tampão fosfato pH 7,4 completaram as condições inerentes à análise.

Observou-se que o melhor intervalo de concentração final de fenol, para um valor máximo de absorbância, foi de 0,85 a 2,55 mmol L⁻¹, uma vez que nesta faixa de concentração, a absorbância do complexo colorido gerado se manteve praticamente estável (figura 25). Para a metodologia analítica foi escolhida a concentração final de fenol de 1,3 mmol L⁻¹ o que equivale a uma diluição de 0,75 mL da solução estoque (17 mmol L⁻¹) para um volume final igual a 10,00 mL.

Para o teste da 4-aminoantipirina verificou-se que a concentração final ótima, para um valor máximo de absorbância, ficou entre 0,15 e 0,45 mmol L⁻¹ (figura 26). Para a metodologia adotada, foi escolhida a concentração final de 4-Aminoantipirina de 0,3 mmol L⁻¹, equivalente a uma diluição de 1,00 mL da solução estoque (3 mmol L⁻¹) para o balão reacional final.

Os estudos demonstraram que a formação do cromóforo anti-pirilquinonimina é dependente das concentrações de fenol e 4-aminoantipirina, para o desencadeamento da reação de acoplamento via formação de radicais livres.

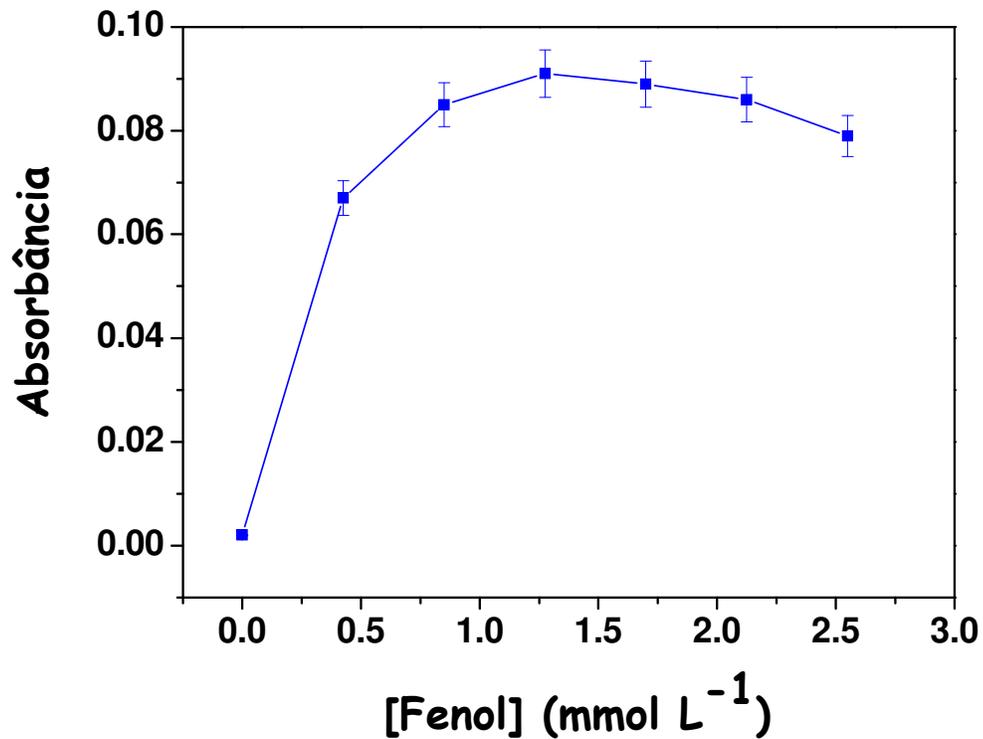


Figura 25: Estudo da influência da concentração de fenol nas medidas espectrofotométricas. Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{final}} = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{4-Aminoantipirina}]_{\text{final}} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4.

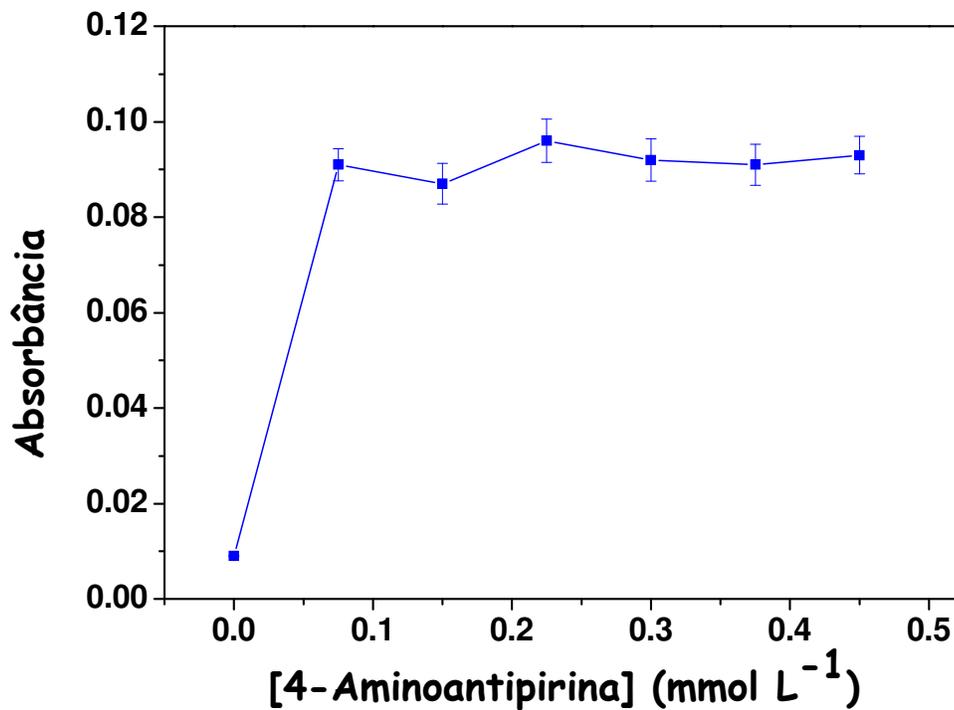


Figura 26: Estudo da influência da concentração de 4-Aminoantipirina nas medidas espectrofotométricas. Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{final}} = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{Fenol}]_{\text{final}} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4.

A determinação da quantidade ideal de peroxidase a ser imobilizada na resina Amberlite IRA-743 com auxílio do agente ativador glutaraldeído foi feita a partir de dez análises em diferentes concentrações da enzima que variavam de 0 a 1150 UI mg⁻¹ (ou 0 a 10 mg de massa da enzima bruta). As concentrações finais de fenol, 4-aminoantipirina, solução carreadora e padrão de H₂O₂, além de volume de injeção e montagem do sistema em fluxo seguiram a otimização do estudo anterior.

A verificação da quantidade de enzima a ser utilizada é um parâmetro importante durante a análise a fim de evitar gastos e desperdícios que gerem uma pesquisa mais dispendiosa. Observou-se que a concentração ótima de peroxidase, para um valor máximo de absorvância, ficou entre 345 e 1150 UI mg⁻¹, uma vez que nesta faixa de concentração, a absorvância do complexo colorido gerado se manteve praticamente constante (figura 27). Para os subseqüentes testes foi escolhido a concentração equivalente de peroxidase de 690 UI mg⁻¹ a ser imobilizada em 250 mg de resina Amberlite IRA-743 com auxílio de 100 µL de GLU em cerca de 30 minutos.

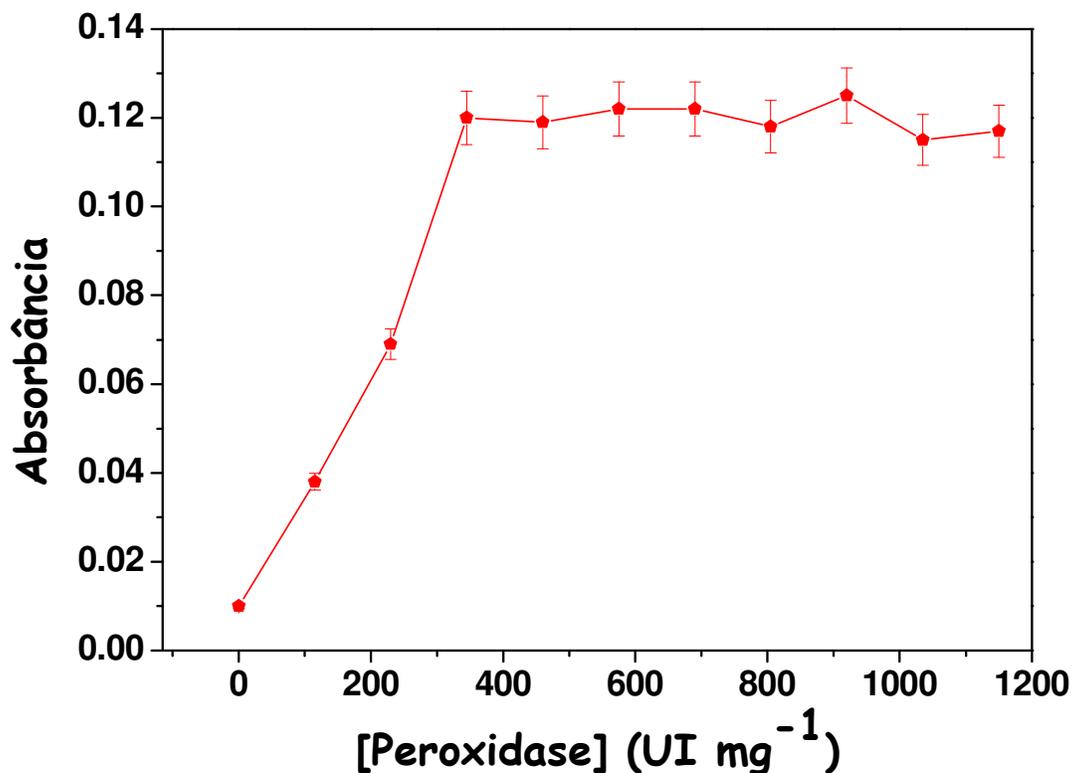


Figura 27: Estudo da influência da concentração de peroxidase nas medidas espectrofotométricas. Dados: [H₂O₂]_{final} = 20 µmol L⁻¹, [Fenol]_{final} = 1,27 mmol L⁻¹, [4-Aminoantipirina]_{final} = 0,3 mmol L⁻¹ e solução tampão fosfato pH 7,4.

4.3.2. Estudo da Imobilização da Peroxidase em Diferentes Resinas

O próximo estudo teve como objetivo verificar a possibilidade da imobilização da peroxidase em outros suportes ou resinas. Uma vez determinada a resina ou um grupo de resinas, aumentou-se a possibilidade de traçar estratégias de imobilização das mais variadas enzimas e projetar novas pesquisas nesta área com ênfase na determinação de compostos em matrizes ambientais, farmacêuticas e alimentares. Duas resinas aniônicas, Amberlite IRA-743 e IRA-400, e uma catiônica, Amberlite IRA-120 foram escolhidas com o propósito de estudar o comportamento de imobilização diante da enzima peroxidase. A Amberlite IRA-400 é uma resina de troca-iônica base forte com propriedades interessantes para determinação, separação, pré-concentração de íons metálicos e deionização da água; enquanto a Amberlite IRA-120 é uma resina de troca catiônica, em gel, com excelente performance na desmineralização de águas, quando em sua forma ácida (H^+).

Seguindo os parâmetros aplicados nos testes anteriores, dez injeções consecutivas de padrões de H_2O_2 à 5 mmol L^{-1} foram testadas nos 3 diferentes tipos de suportes imobilizados com a enzima peroxidase. Um volume de injeção de $200 \mu\text{L}$ foi utilizado no sistema FIA para execução da análise.

Verificou-se que a resina Amberlite IRA-743 foi a que obteve melhores resultados frente à imobilização da peroxidase, mantendo constante e proporcional os valores das absorbâncias frente uma concentração final de H_2O_2 ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) quando comparadas às demais resinas (figura 28). Se levarmos em conta o parâmetro da atividade média da POD imobilizada na Amberlite IRA-743, em termos de absorbância, a resina Amberlite IRA-400 teve um desempenho de apenas 0,5%, ao passo que a Amberlite IRA-120 teve sua atividade em 95%, 24% e 8%, da primeira a quarta, da quinta a sétima e da oitava a décima medidas, respectivamente. Conclui-se que os dois últimos suportes não seriam adequados e poderiam ser desconsiderados para as posteriores análises, o que reforça a idéia da importância do grupamento funcional no processo de formação da ligação covalente entre o ativador e a enzima a ser imobilizada.

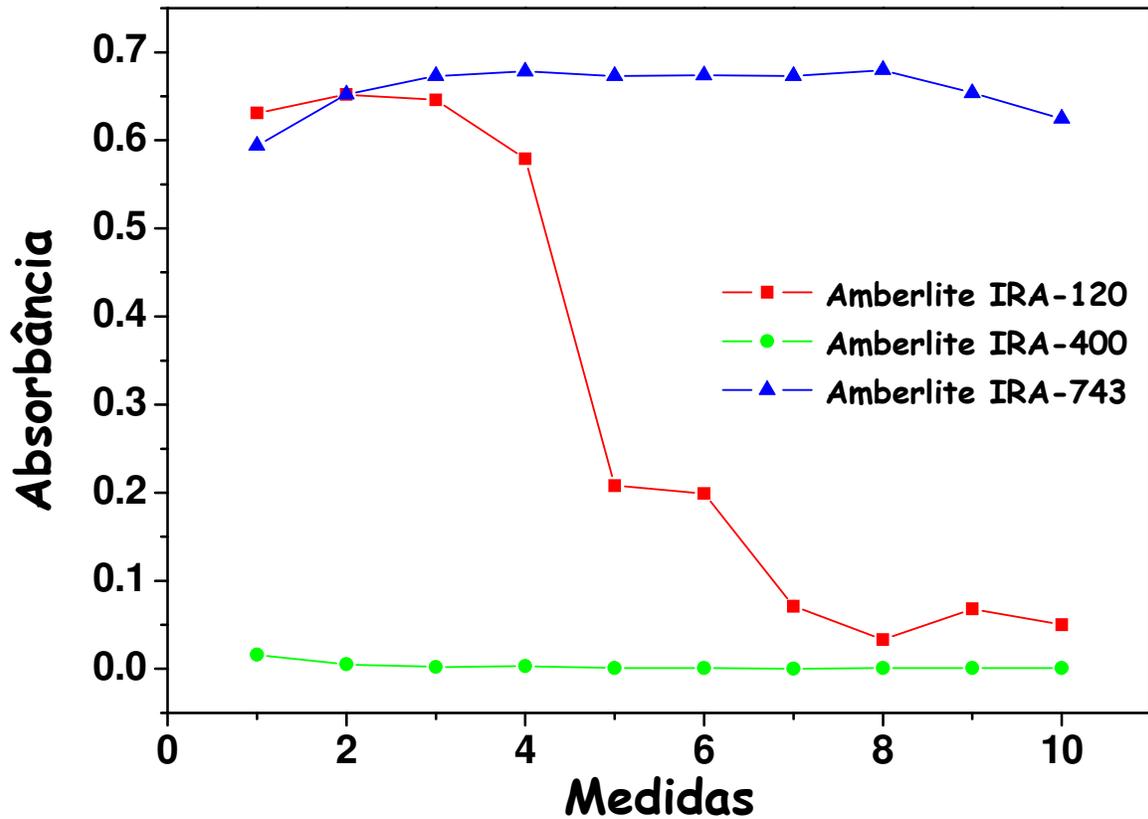


Figura 28: Estudo da imobilização enzimática em diferentes tipos de resinas nas medidas espectrofotométricas. Dados: $[H_2O_2]_{final} = 100 \mu mol L^{-1}$, $[Fenol]_{final} = 1,27 mmol L^{-1}$, $[4\text{-Aminoantipirina}]_{final} = 0,3 mmol L^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4.

4.3.3. Estudo da Estabilidade do Reator Enzimático e Reutilização do Suporte

No estudo da estabilidade enzimática dois reatores, preparados separadamente, sob as mesmas condições, foram escolhidos a fim de serem submetidos a 30 injeções consecutivas de padrões de H_2O_2 a 0,5 e 5,0 $mmol L^{-1}$. Concentrações de fenol, 4-aminoantipirina e volume de injeção foram às mesmas usadas no item 4.3.1. A figura 29 mostra que o reator perdeu sua capacidade catalítica enzimática (cerca de 64%) de reação a partir da vigésima injeção, provavelmente devido a alta concentração final de H_2O_2 , em 100 $\mu mol L^{-1}$. Da 1ª a 5ª medida revelou-se também que os valores de

absorbância ficaram abaixo da média entre os demais até a 20ª injeção no sistema em fluxo. Fato este poderia estar relacionado à presença de um excesso de peroxidase no reator tubular que não foi imobilizada. Esta ao ser carregada pelo eletrólito até o balão volumétrico reacional poderia interferir na geração do complexo colorido anti-pirilquinonimina. Conseqüentemente, a lavagem dos reatores com a própria solução transportadora (tampão fosfato pH 7,4), por alguns minutos no sistema em fluxo, se fez necessária para os subseqüentes estudos para retirar o excesso de peroxidase do sistema.

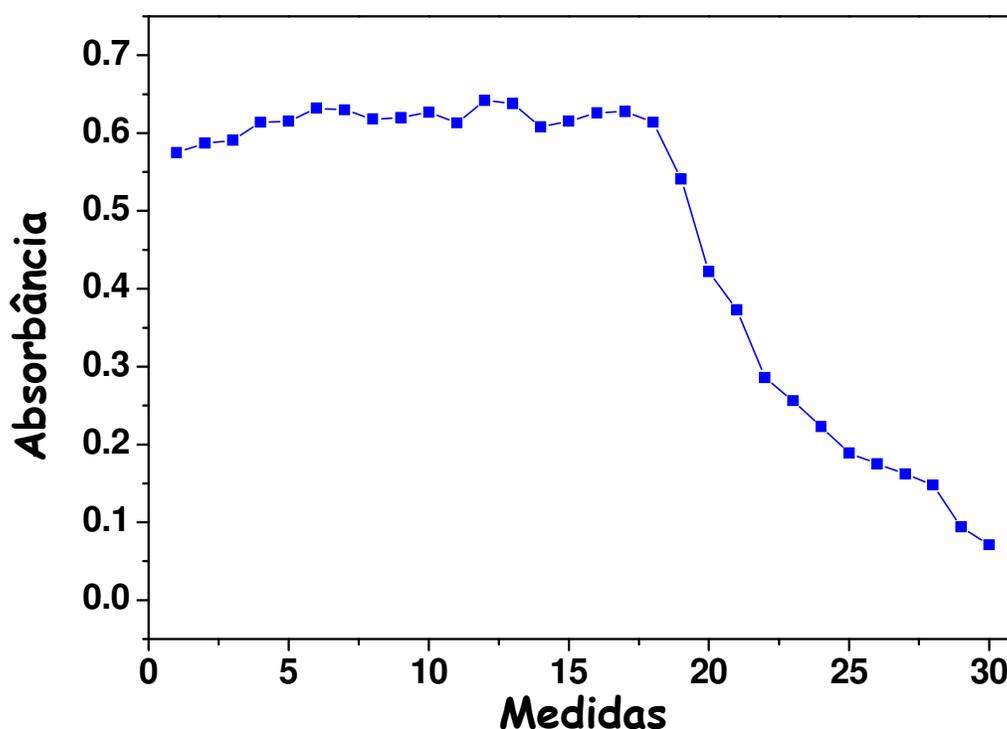


Figura 29: Estudo da estabilidade do reator imobilizado com a enzima peroxidase em 30 medidas. Dados: $[H_2O_2]_{final} = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[Fenol]_{final} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[4\text{-Aminoantipirina}]_{final} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4.

Já a avaliação da estabilidade do reator para uma concentração final de H_2O_2 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ mostrou que a enzima peroxidase resiste às 30 injeções, sem perda substancial de atividade, mantendo-se praticamente constante os valores de absorbância obtidos (figura 30). O coeficiente de variância (CV) encontrado foi de 4% demonstrando a repetibilidade da sequência de medidas.

Como o teor de H_2O_2 no mel é de uma ordem de grandeza próxima ao $\mu\text{g g}^{-1}$, um único reator imobilizado demonstra potencial de estabilidade para analisar várias amostras em seqüência.

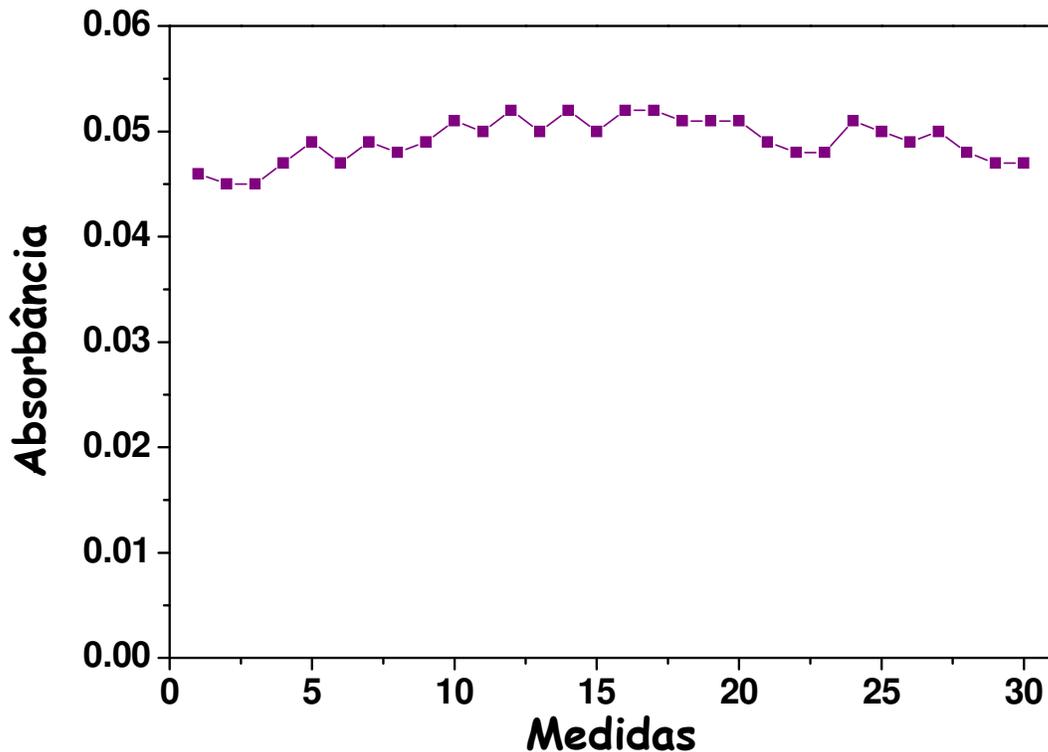


Figura 30: Estudo da estabilidade do reator imobilizado com a enzima peroxidase em 30 medidas. Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{final}} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{Fenol}]_{\text{final}} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{4-Aminoantipirina}]_{\text{final}} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4.

O estudo da estabilidade do reator imobilizado frente à estocagem e nova reutilização também foram avaliados. Em 8 semanas de teste, o reator enzimático demonstrou estabilidade em pelo menos 3 semanas, com posterior perda de atividade até a última semana, que em termos percentuais ficaram entre 30-70%. A cada semana 50 injeções foram realizadas, e os CVs encontrados, respectivamente, para os períodos de estabilidade foram de 3%, 4% e 5%. Enquanto não estavam sendo utilizados, eles foram armazenados em *freezer* a temperaturas de $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Considerou-se a 1ª semana de teste, a semana 0, enquanto a última, a 8ª semana de análise (figura 31). Concluiu-se que a perda da atividade enzimática não se deve ao período de estocagem e sim ao

excesso de injeções sucessivas de H_2O_2 (150 injeções), o que ocasionou a diminuição da concentração da enzima nas subseqüentes análises, por isso, valores de absorbância para o complexo anti-pirilquinonimina inferiores foram observados nas semanas seguintes.

Em função da estabilidade verificada, criou-se um protocolo de reutilização e estocagem enzimática a fim de estudar o comportamento do reator mediante várias condições de análise e a manutenção de suas propriedades catalíticas (figura 32).

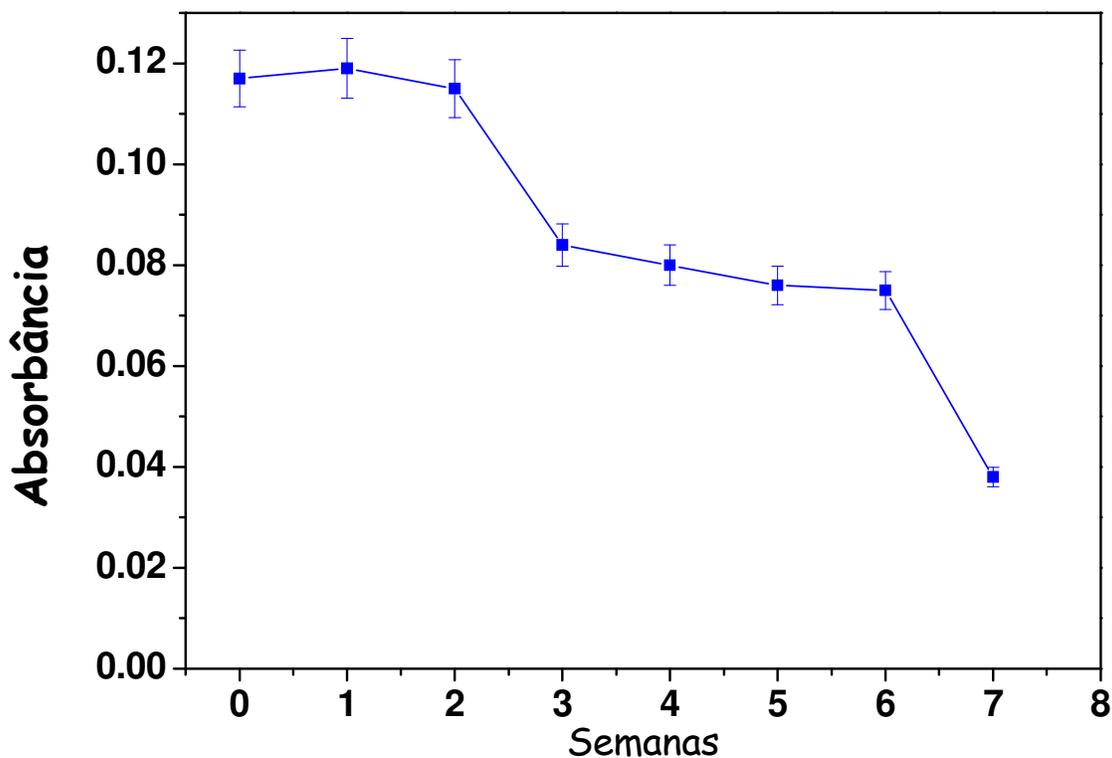
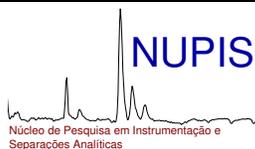


Figura 31: Estabilidade do reator imobilizado frente à estocagem à -20°C e sua posterior reutilização, em semanas. Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{final}} = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{Fenol}]_{\text{final}} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{4-Aminoantipirina}]_{\text{final}} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



NÚCLEO DE PESQUISAS EM INSTRUMENTAÇÃO E SEPARAÇÕES ANALÍTICAS
(NUPIS)

PROTOCOLO DE ESTOCAGEM DOS REATORES TUBULARES ENZIMÁTICOS

OBJETIVOS

Estabelecer parâmetros para condicionamento e reutilização de reatores tubulares enzimáticos;

Avaliar a perda da atividade enzimática conforme parâmetros e metodologia utilizados.

ENZIMA

Peroxidase E.C. 1.11.1.7 (horseradish 115 UI mg⁻¹) - Seppim[®], França.

COMPOSIÇÃO REATOR TUBULAR

Amberlite IRA-743 – GLUTARALDEÍDO – PEROXIDASE.

PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO

Tratar inicialmente a resina Amberlite IRA-743 (250 mg), escolhida como suporte, com 100 µL de glutaraldeído 0,1 % (IRA - GLU), por 10 minutos, sob constante agitação. Adicionar 690 UI (6 mg) de peroxidase (IRA - GLU - POD) deixando em contato por 20 minutos, sob agitação magnética para favorecer a interação GLU - POD. Preparar o reator tubular ($\phi = 0,26$ cm, 2,2 cm de comprimento) com a resina imobilizada ao GLU e POD e posterior lavagem com solução tampão fosfato (pH 7,4) para retirar o excesso de reagente. Quando os reatores não estiverem sendo usados eles foram armazenados em *freezer* sob uma temperatura de - 20 °C.

METODOLOGIA

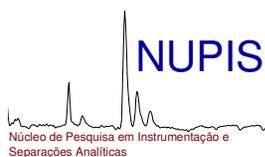
Determinação espectrofotométrica e amperométrica de H₂O₂ por análise de injeção em fluxo em amostras de mel.

NÚMERO e CONDIÇÕES FINAIS DE ANÁLISE

50 injeções / análise / semana.

Dados: [H₂O₂]_{final} = 20 µmol L⁻¹, [Fenol]_{final} = 1,27 mmol L⁻¹, [4-Aminoantipirina]_{final} = 0,3 mmol L⁻¹ e solução tampão fosfato pH 7,4.

Figura 32: Protocolo de estocagem dos reatores tubulares enzimáticos - PEROXIDASE.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



NÚCLEO DE PESQUISAS EM INSTRUMENTAÇÃO E SEPARAÇÕES ANALÍTICAS
(NUPIS)

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Perda da atividade enzimática por agentes desnaturantes como temperatura, pH, excesso de substrato e reações paralelas com outras espécies químicas.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

SEMANA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (%)	PERDA (%)
0	100%	-
1	100%	0%
2	97%	3%
3	71%	29%
4	67%	33%
5	64%	36%
6	63%	37%
7	32%	68%

CONCLUSÕES

A enzima manteve suas atividades enzimáticas quase que totais durante três semanas de análise. Nas semanas seguintes houve uma perda substancial de atividade de 33 a 68% (4^a a 8^a semana).

DESACONSELHA-SE o uso do reator enzimático, nas condições estabelecidas, a partir da 4^a semana de análise, por diminuição da atividade catalítica total da peroxidase.

	NOME	ASSINATURA	DATA
Elaborado por	<i>Romulo Augusto de Abreu Franchini</i>		
Aprovado por	<i>Renato Camargo Matos</i>		
Revisado por	<i>Renato Camargo Matos</i>		

Outro aspecto que não deve ser desconsiderado é a possibilidade de reutilização do suporte para a imobilização enzimática. Da mesma maneira que as enzimas, as resinas de troca iônica representam uma boa parcela de custo para as pesquisas. Avaliar seu acondicionamento e desenvolver protocolos, portanto, é tarefa importante para uma economia final de gastos. O teste destacou a capacidade de reciclagem da resina Amberlite IRA-743 para novas imobilizações enzimáticas com a peroxidase, e também para outras enzimas (vide capítulo 6), sem a perda da capacidade reacional.

Submeteram-se ao sistema em fluxo os mesmos parâmetros anteriores estabelecidos. Após o experimento, retirou-se a resina do reator tubular e procedeu a sua lavagem com tampão fosfato pH 7,4 e secagem em estufa a 100 °C por 30 minutos. Então, a Amberlite IRA-743 foi novamente imobilizada com a enzima peroxidase (vide item 4.2.3) e um novo teste executado, levando em conta os mesmos parâmetros do original que o precedeu, com 15 medidas de absorvância. A figura 33 mostra que o procedimento de reutilização foi viável e a resina apresentou a mesma capacidade de imobilização e a atividade enzimática da peroxidase foi mantida. Os CVs das medidas ficaram em 2,5% para utilização da resina no procedimento tradicional e 1,6% após lavagem, secagem e reutilização.

O acondicionamento da resina também foi estudado frente ao número de reciclagens e reutilizações. Verificou-se que a Amberlite IRA-743 manteve suas propriedades imobilizadoras até a 13ª reutilização, após esta, a atividade enzimática ficou comprometida. Muito provavelmente, este efeito se deve, a possíveis alterações estruturais e aos grupos funcionais metilglucamina da Amberlite IRA-743. Vinte injeções foram escolhidas para cada análise, os CVs variaram entre 2% e 6%. Considerando que da 1ª a 12ª análise a atividade da peroxidase, manteve-se praticamente em 100%; da 13ª a 16ª e da 17ª a 20ª, houve uma perda substancial, respectivamente, de 19% e 66% da atividade enzimática (figura 34). As condições da análise foram às mesmas do estudo anterior.

Novamente foi criado um protocolo de acondicionamento, desta vez da resina utilizada como suporte nas imobilizações enzimáticas (figura 35).

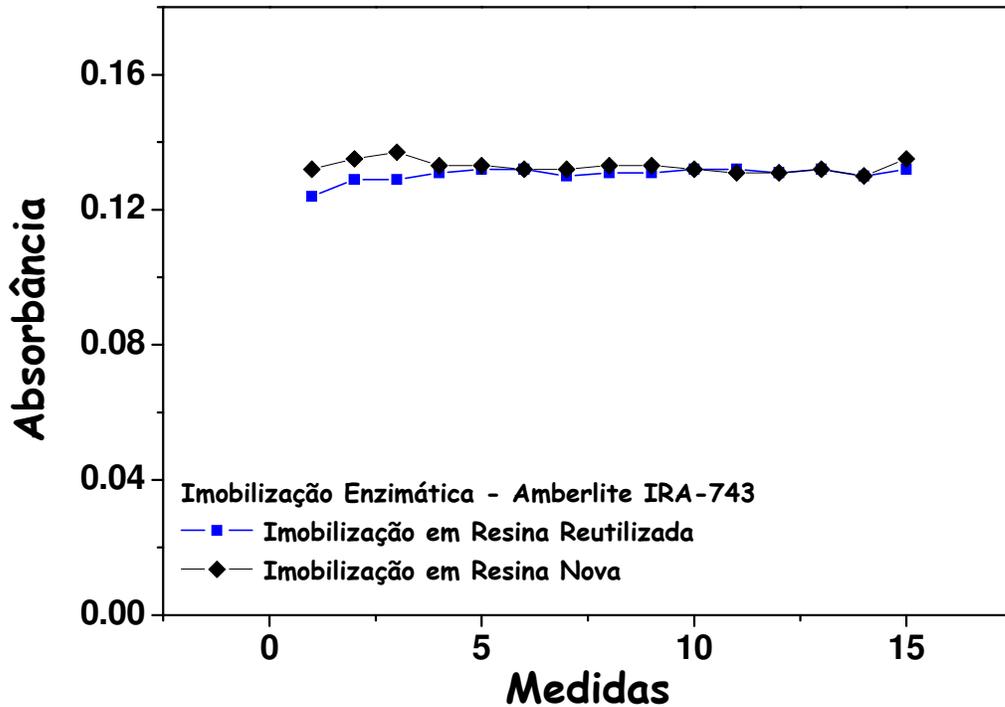


Figura 33: Teste de reutilização da resina Amberlite IRA-743 com nova imobilização enzimática da peroxidase, após lavagem e secagem do suporte em estufa por 100^o C. Dados: $[H_2O_2]_{final} = 20 \mu mol L^{-1}$, $[Fenol]_{final} = 1,27 mmol L^{-1}$, $[4\text{-Aminoantipirina}]_{final} = 0,3 mmol L^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4.

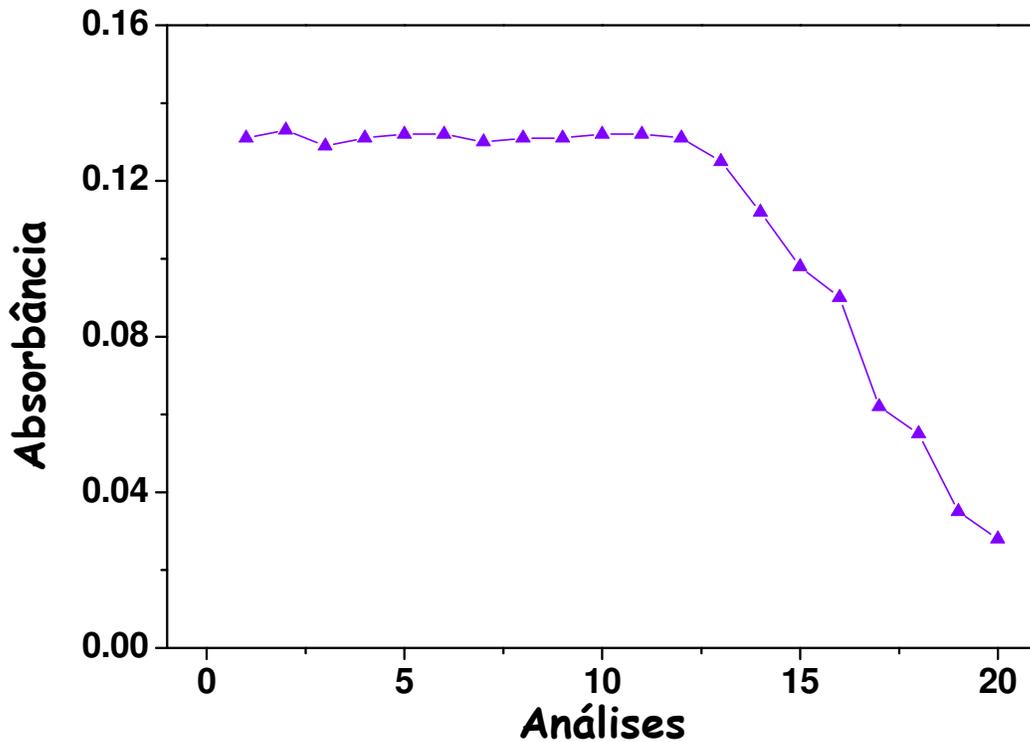


Figura 34: Vinte reutilizações da resina Amberlite IRA-743 para imobilização da enzima peroxidase. Dados: $[H_2O_2]_{final} = 20 \mu mol L^{-1}$, $[Fenol]_{final} = 1,27 mmol L^{-1}$, $[4\text{-Aminoantipirina}]_{final} = 0,3 mmol L^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



NÚCLEO DE PESQUISAS EM INSTRUMENTAÇÃO E SEPARAÇÕES ANALÍTICAS
(NUPIS)

PROTOCOLO DE REUTILIZAÇÃO DE RESINAS OU SUPORTES

OBJETIVOS

Estabelecer parâmetros para reutilização de resinas ou suportes que auxiliem nas imobilizações enzimáticas e construções de reatores tubulares;

Avaliar a eficiência perda da atividade enzimática conforme parâmetros e metodologia.

RESINA / TIPO

- Amberlite IRA-743 Amberlite IRA-120 Amberlite IRA-400
 Sílica Aminopropilada Sílica Sílica Porosa
 Capilar Sílica Fundida Resina Metacrilato Aminopropil-CPG
 Outros: _____

Resina aniônica poliestirênica com grupo funcional metilglucamina.

ORIGEM

Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, USA).

COMPOSIÇÃO REATOR TUBULAR

Amberlite IRA-743 – GLUTARALDEÍDO – PEROXIDASE.

PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO

Tratar inicialmente a resina Amberlite IRA-743 (250 mg), escolhida como suporte, com 100 µL de glutaraldeído 0,1 % (IRA - GLU), por 10 minutos, sob constante agitação. Adicionar 690 UI (6 mg) de peroxidase (IRA - GLU - POD) deixando em contato por 20 minutos, sob agitação magnética para favorecer a interação GLU - POD. Preparar o reator tubular ($\phi = 0,26$ cm, 2,2 cm de comprimento) com a resina imobilizada ao GLU e POD e posterior lavagem com solução tampão fosfato (pH 7,4) para retirar o excesso de reagente. Quando os reatores não estiverem sendo usados eles foram armazenados em *freezer* sob uma temperatura de - 20 °C.

METODOLOGIA

Determinação espectrofotométrica e amperométrica de H₂O₂ por análise de injeção em fluxo em amostras de mel.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



NÚCLEO DE PESQUISAS EM INSTRUMENTAÇÃO E SEPARAÇÕES ANALÍTICAS
(NUPIS)

NÚMERO e CONDIÇÕES FINAIS DE ANÁLISE

15 injeções / análise.

Dados: $[H_2O_2]_{final} = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[Fenol]_{final} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[4\text{-Aminoantipirina}]_{final} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4.

PROCEDIMENTO DE SECAGEM

Após a análise, retirar o conjunto suporte-enzima do reator tubular com auxílio de uma seringa comercial de polietileno, sem agulha, e coletar em um béquer de 10 mL. Lavar exaustivamente com solução tampão fosfato pH 7,4. Drenar, com máximo cuidado, o excesso de eletrólito que, porventura, tenha ficado no béquer, e colocar o mesmo em uma estufa (315-E da Fanem[®], São Paulo, SP) à 100 °C por 30 minutos.

Após este período, proceder nova imobilização como descrito anteriormente.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

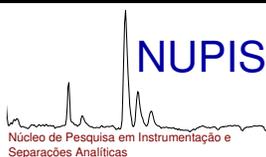
Perda mecânica ou desperdício da resina ao preparar e/ou retirar o suporte do reator tubular enzimático.

Secagem em temperaturas e períodos acima do estabelecido.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA / INJEÇÕES

Esta avaliação tem como objetivo avaliar a manutenção da atividade enzimática em 15 injeções sucessivas de H_2O_2 .

INJEÇÕES	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (%)		PERDA
	Imobilização Tradicional	Imobilização Resina Reutilizada	
5			
10			
15	100%	101%	-
20			
25			
30			
35			
40			
45			
50			



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**NÚCLEO DE PESQUISAS EM INSTRUMENTAÇÃO E SEPARAÇÕES ANALÍTICAS
(NUPIS)**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA / ANÁLISES

Esta avaliação tem como objetivo verificar a manutenção da atividade enzimática em grupos de análises com 15 injeções cada de H₂O₂.

ANÁLISES	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (%) <i>Imobilização Resina Reutilizada</i>	PERDA
1 ^a a 4 ^a	100%	-
5 ^a a 8 ^a	100%	-
9 ^a a 12 ^a	100%	-
13 ^a a 16 ^a	81%	19%
16 ^a a 20 ^a	34%	66%

CONCLUSÕES

A atividade enzimática manteve-se praticamente constante nas 15 análises, comprovando que a lavagem, secagem e reutilização da resina Amberlite IRA-743 é um procedimento viável, em termos de economia, mantendo-se a confiabilidade da metodologia.

Nas subseqüentes reutilizações, a resina manteve suas propriedades de suporte até a 13^a reciclagem, após esta; a atividade enzimática ficou comprometida, devido a falhas no processo de imobilização enzimática. Muito provavelmente, este efeito se deve, a possíveis alterações estruturais e nos sítios ativos da Amberlite IRA-743.

DESACONSELHA-SE a imobilização enzimática com reciclagem da resina Amberlite IRA-743 após a 13^a reutilização por diminuição da atividade catalítica total da peroxidase.

	NOME	ASSINATURA	DATA
Elaborado por	<i>Romulo Augusto de Abreu Franchini</i>		
Aprovado por	<i>Renato Camargo Matos</i>		
Revisado por	<i>Renato Camargo Matos</i>		

4.3.4. Estudo do Tempo de Imobilização

O tempo analítico de imobilização da enzima à resina Amberlite IRA-743 foi usado para avaliar a eficiência do procedimento em 2 intervalos de tempo: 30 minutos e 24 horas. O objetivo do estudo foi provar a eficácia da imobilização em períodos curtos de tempo em comparação a alguns procedimentos tradicionais que levam horas e até dias para preparar um sistema reacional enzimático [140, 143]. A figura 36 mostra que a reação Amberlite IRA-743 – GLU – POD não é influenciada pelo excesso de tempo e que as imobilizações feitas em 30 minutos e 24 horas apresentam resultados semelhantes para o sistema analítico adotado. Nas 15 injeções de H_2O_2 , os parâmetros seguidos foram os mesmos anteriores e a precisão das medidas mostrou um CV de 3% e 4% para as imobilizações em 30 minutos e 24 horas, respectivamente.

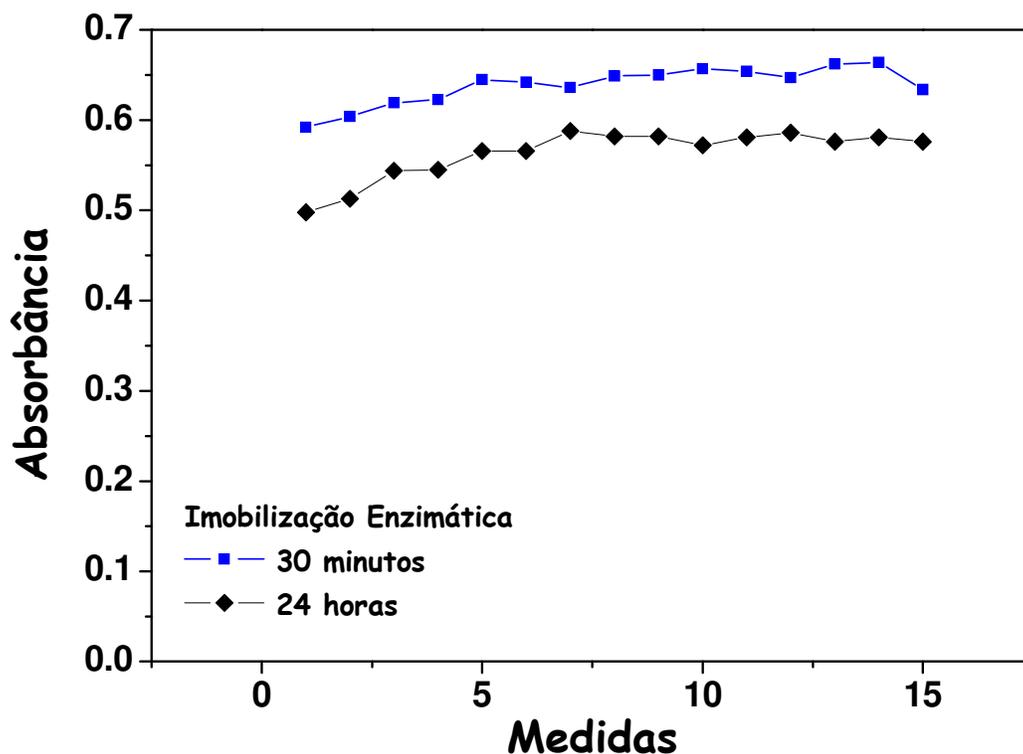


Figura 36: Estudo da imobilização da peroxidase com a resina Amberlite IRA-743 - GLU em 30 minutos e 24 horas. Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{final}} = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{Fenol}]_{\text{final}} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{4-Aminoantipirina}]_{\text{final}} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4.

4.3.5. Estudo da Influência da Temperatura

O estudo teve como objetivo verificar a estabilidade da peroxidase imobilizada em diferentes temperaturas e avaliar sua possível desnaturação. Antes da montagem do reator tubular no tubo de polietileno, 4 sistemas Amberlite IRA-743 – GLU – POD foram introduzidos em um banho termostático em 4 valores diferentes de temperaturas por 30 minutos. Após o período, o mesmo procedimento descrito no item anterior foi executado e as respectivas absorbâncias foram medidas para uma concentração final de H_2O_2 de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. A figura 37 demonstra que em temperaturas de 30°C a 50°C a atividade da enzima peroxidase e o complexo colorido mantiveram-se estáveis, sendo semelhante aos testes anteriores realizados em temperatura ambiente de 25°C . Em 60°C a formação do complexo colorido anti-pirilquinonimina ficou comprometida, ocasionando um decréscimo dos valores de absorbância. Esta baixa estabilidade em temperaturas elevadas e a redução da atividade catalítica muito provavelmente se devem à desnaturação da enzima peroxidase.

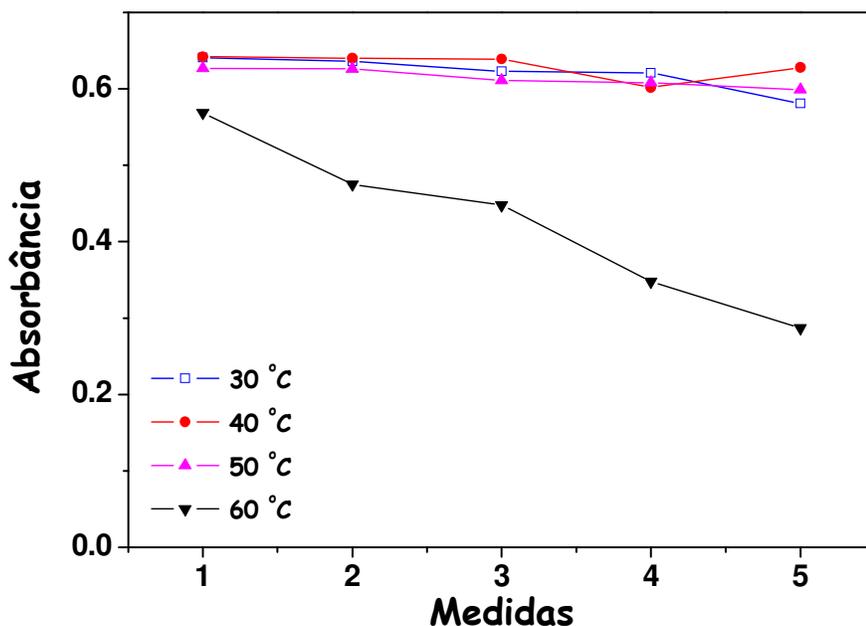


Figura 37: Estudo da influência da temperatura na estabilidade da enzima peroxidase. Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{final}} = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{Fenol}]_{\text{final}} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{4-Aminoantipirina}]_{\text{final}} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4.

4.3.6. Estudo de Possíveis Interferentes

O mel, como discutido na introdução deste trabalho, é uma matriz complexa composta de inúmeros componentes dentre os quais se destacam os carboidratos que correspondem a cerca de 80% de sua constituição. Frutose, glicose e sacarose são os representantes com maior concentração encontrados nas amostras de mel. O estudo teve como objetivo verificar a influência de alguns carboidratos na geração da anti-pirilquinonimina. Soluções de glicose e frutose 50 mmol L^{-1} foram preparadas e injetadas no sistema em fluxo com um volume de injeção de $200 \mu\text{L}$ e coletadas em balões volumétricos de $10,00 \text{ mL}$. De forma análoga, injetaram-se soluções padrões de H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, para comparar com os resultados obtidos com os açúcares. Parâmetros anteriormente descritos foram mantidos. A figura 38 demonstra que glicose e frutose não influenciaram na formação do complexo colorido anti-pirilquinonimina. Os valores de absorbância foram tão baixos que podem ser associados ao branco da análise, conseqüentemente a quantificação do H_2O_2 não foi comprometida por estes possíveis interferentes.

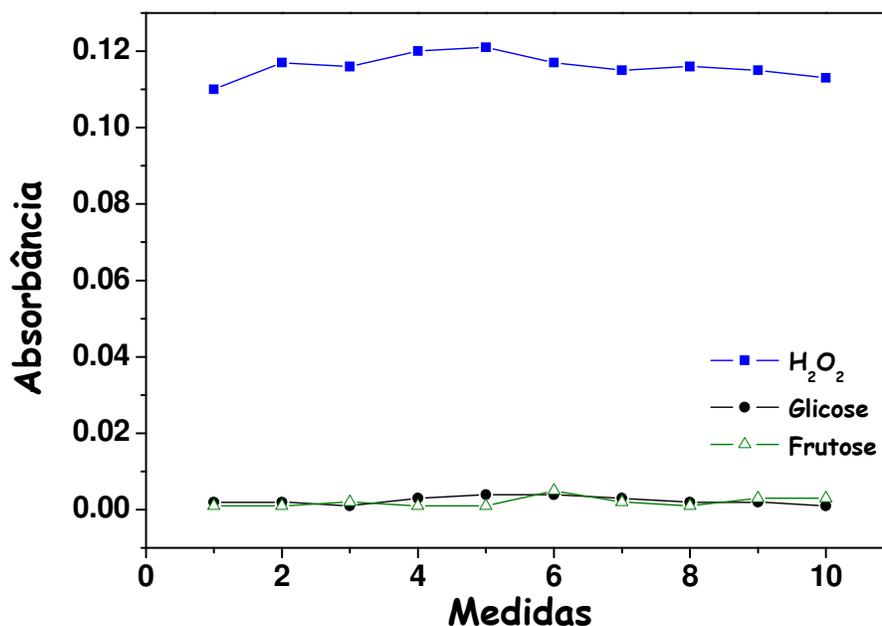


Figura 38: Estudo de possíveis interferentes (glicose e frutose) na formação do complexo colorido anti-pirilquinonimina. Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{final}} = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{Glicose}]_{\text{final}} = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{Frutose}]_{\text{final}} = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{Fenol}]_{\text{final}} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{4-Aminoantipirina}]_{\text{final}} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato pH 7,4.

4.3.7. Efeito da Diluição na Geração do H_2O_2

As pesquisas relatam que o mel só apresentará teores ativos de H_2O_2 quando diluído, com um conseqüente aumento no poder anti-séptico e antibacteriano da ordem 2.500 a 50.000 vezes, sem causar qualquer dano tecidual se aplicado com a finalidade terapêutica. Em soluções diluídas, a atividade da glicose oxidase nas amostras aumenta, gerando mais H_2O_2 e uma maior contribuição da atividade antimicrobiana do mel [52-54, 65, 66]. Com o intuito de investigar esta característica, algumas amostras foram submetidas a diluições em solução tampão fosfato pH 7,4 e água desionizada, a fim de verificar a influência na geração de H_2O_2 , por uma maior atividade da glicose oxidase.

Neste experimento, 3 exemplares de mel foram escolhidos: Manuka +5 (amostra 1), Silvestre Teresópolis (amostra 13) e Eucalipto Teresópolis (amostra 15). Para cada amostra, 2 massas foram pesadas (5 e 10 g) e diluídas em 5 balões volumétricos de 50,00 mL cada uma, obtendo-se uma concentração final próxima a 10% e 20%, respectivamente. Em cada balão estipulou-se um período de diluição: 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. Após cada intervalo procederam-se os testes, em triplicata, conforme item anterior para a determinação espectrofotométrica de H_2O_2 .

As figuras 39 e 40 demonstram, respectivamente, as diluições de 10% e 20% (m/v) em solução tampão fosfato e água desionizada. Nas diluições feitas com água desionizada verificou-se pouca variação dos valores de absorbância, entretanto quando se fez uma comparação com a solução tampão fosfato, observou-se um incremento dos valores medidos no espectrofotômetro. Nas diluições de 10% e 20% (m/v), o mel Manuka +5, apresentou um aumento de 75% de intensidade de absorbância entre o primeiro intervalo e em 120 minutos de diluição. No mel Silvestre ou Multifloral Teresópolis houve variação de mais de 100% na absorbância entre o tempo da primeira e a última diluição. Finalmente, a amostra Eucalipto Teresópolis apresentou valores de elevação de absorbância próximos a 30%. O estudo indicou que quanto maior o tempo de diluição das amostras maior a geração de H_2O_2 , porém não foi totalmente conclusivo e nem revelou um padrão percentual de aumento de absorbância. Tal comportamento

pode ser justificado, por exemplo, por fatores inerentes à amostra, como tempo da colheita e estocagem, condições de armazenamento e manipulação, dentre outros. Em todos os experimentos os CVs foram inferiores à 5%. Na determinação de H_2O_2 , anteriormente descrita, estipulou-se um tempo mínimo de 60 minutos para as diluições e a realização da análise via injeção em fluxo a fim de contemplar possíveis variações entre as amostras.

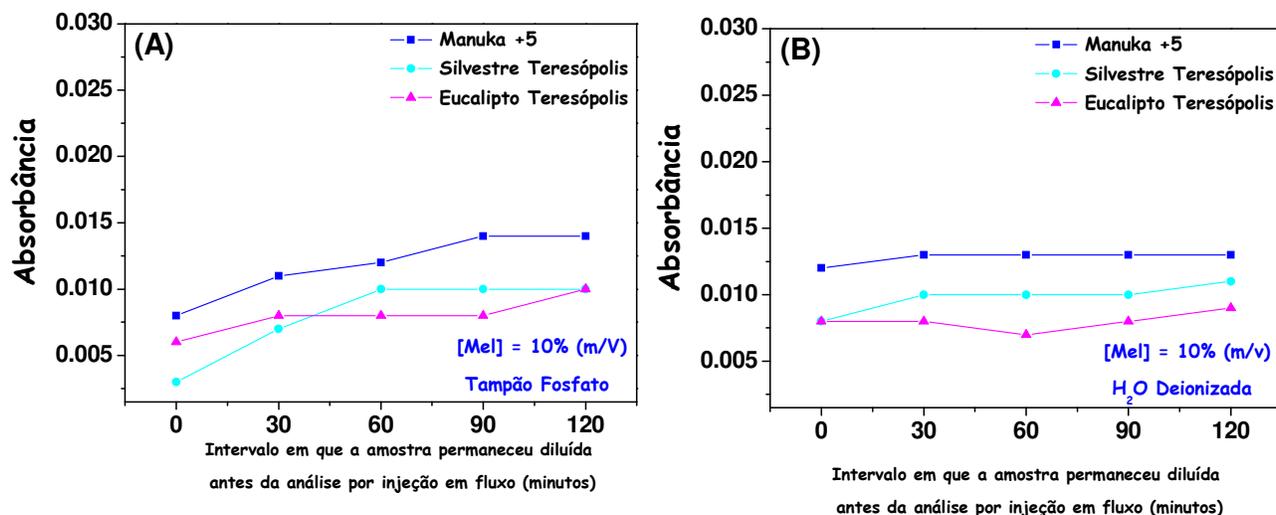


Figura 39: Efeito do tempo de diluição na geração do H_2O_2 e formação do complexo colorido anti-pirilquinonimina. Dados: (A), solução tampão fosfato e (B), H_2O desionizada; amostras de mel, 10% (m/v): Manuka +5, Silvestre e Eucalipto Teresópolis; $[\text{Fenol}]_{\text{final}} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{4-Aminoantipirina}]_{\text{final}} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$.

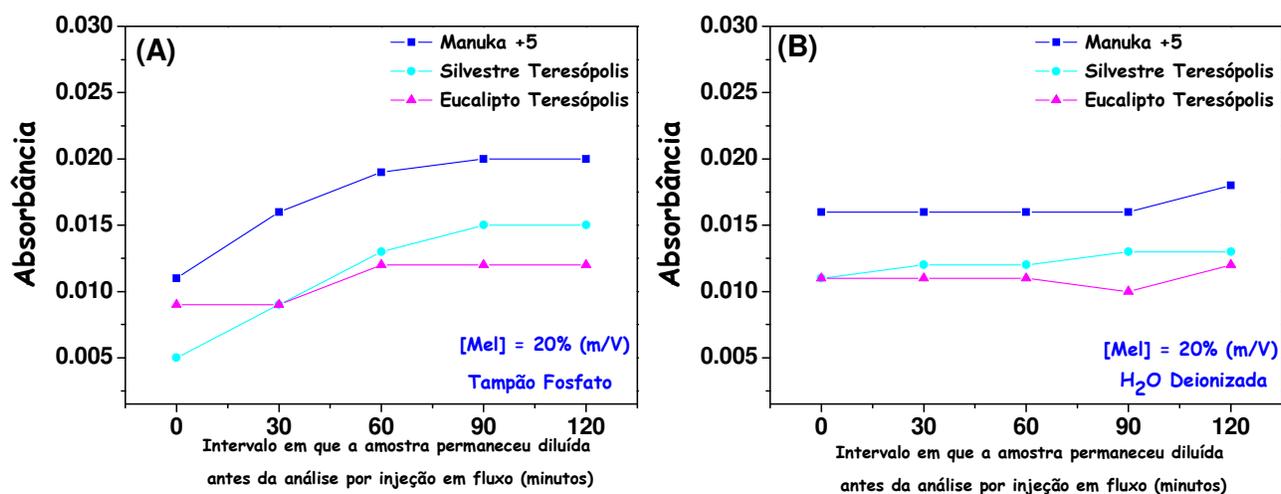


Figura 40: Efeito do tempo de diluição na geração do H_2O_2 e formação do complexo colorido anti-pirilquinonimina. Dados: (A), solução tampão fosfato e (B), H_2O desionizada; amostras de mel, 20% (m/v): Manuka +5, Silvestre e Eucalipto Teresópolis; $[\text{Fenol}]_{\text{final}} = 1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{4-Aminoantipirina}]_{\text{final}} = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$.

4.3.8. Curva Analítica

Os parâmetros geralmente envolvidos na validação de métodos analíticos são curva analítica, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez. A curva analítica procura demonstrar a linearidade do método analítico, isto é, a habilidade das respostas analíticas serem diretamente proporcionais às concentrações das substâncias em estudo. Normalmente, verifica-se analisando em triplicata soluções padrão com 5 ou mais concentrações diferentes, dispostas em um intervalo estabelecido pela faixa de trabalho. A utilidade da regressão linear é representar a dependência de uma variável quantitativa em relação à outra por meio de uma equação simples. [162]

A curva de calibração para a determinação de H_2O_2 teve como objetivo relacionar o teor de padrões de H_2O_2 com as medidas de absorbância para cada ponto da curva, feito em triplicata. Duas curvas foram construídas em faixas diferentes de concentração final de H_2O_2 : 1,0 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 10 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (figura 41A e 41B). Ao traçar uma única curva que contemple a concentração dos padrões de H_2O_2 de 1,0 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (figura 42), encontra-se um coeficiente de correlação linear de 0,99971.

Limite de detecção (LD) é a mais baixa concentração da substância que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental, enquanto limite de quantificação (LQ) é a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser quantificada com certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental ou o ponto mais baixo da curva analítica que não deve ser determinado por extrapolação. O LD é calculado a partir do branco mais três vezes seu desvio padrão ($s_b + 3s$) enquanto o LQ é o valor do branco mais 10 vezes seu desvio padrão ($s_b + 10s$). O desvio padrão do branco pode ser feito tendo como base a variação das medidas do branco analítico, da linha de base ou de um padrão de concentração muito baixa do elemento e/ou espécie a ser determinada.

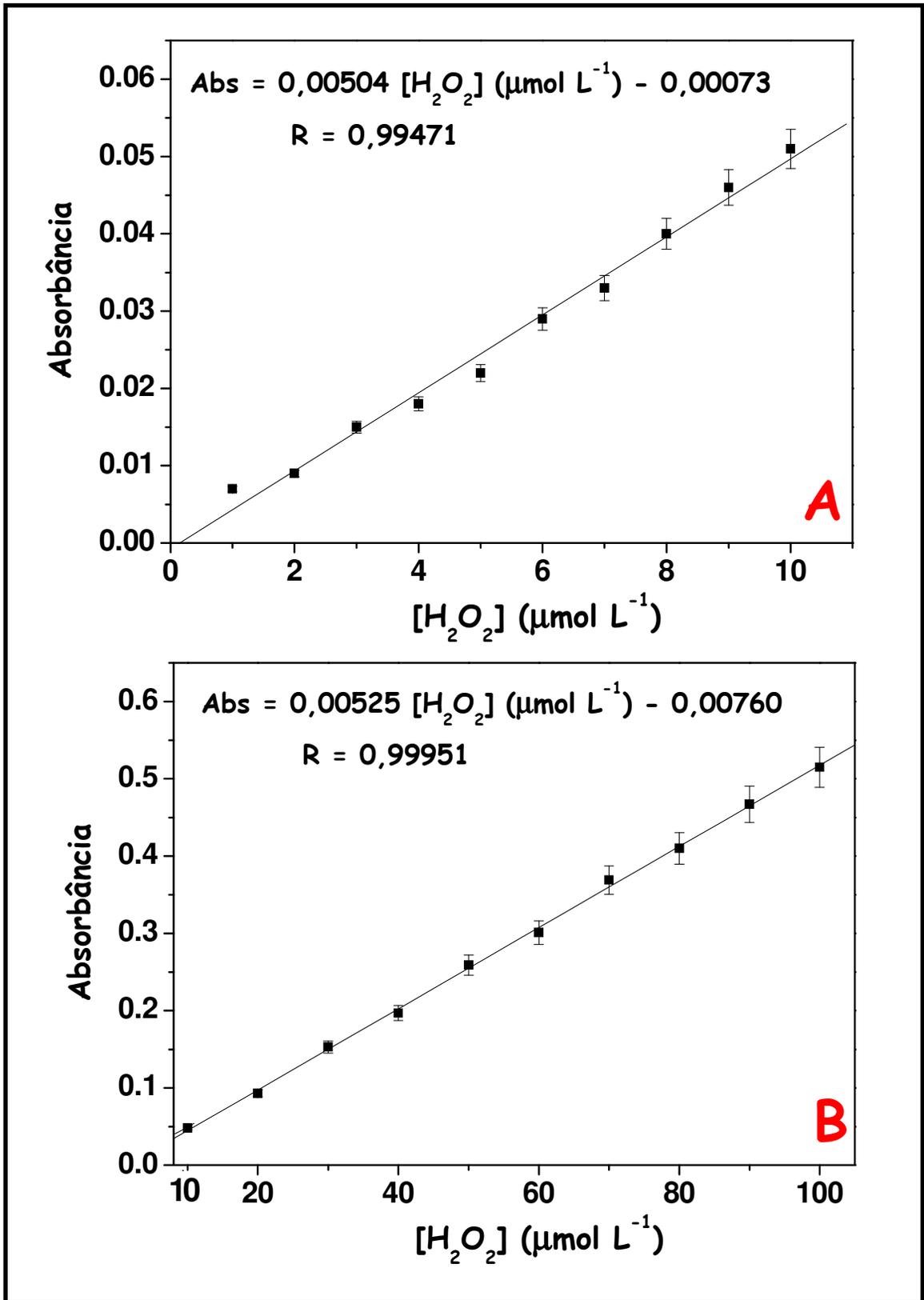


Figura 41: Curva analítica para determinação espectrofotométrica de H_2O_2 com concentrações variando de (A) 1,0 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) 10 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

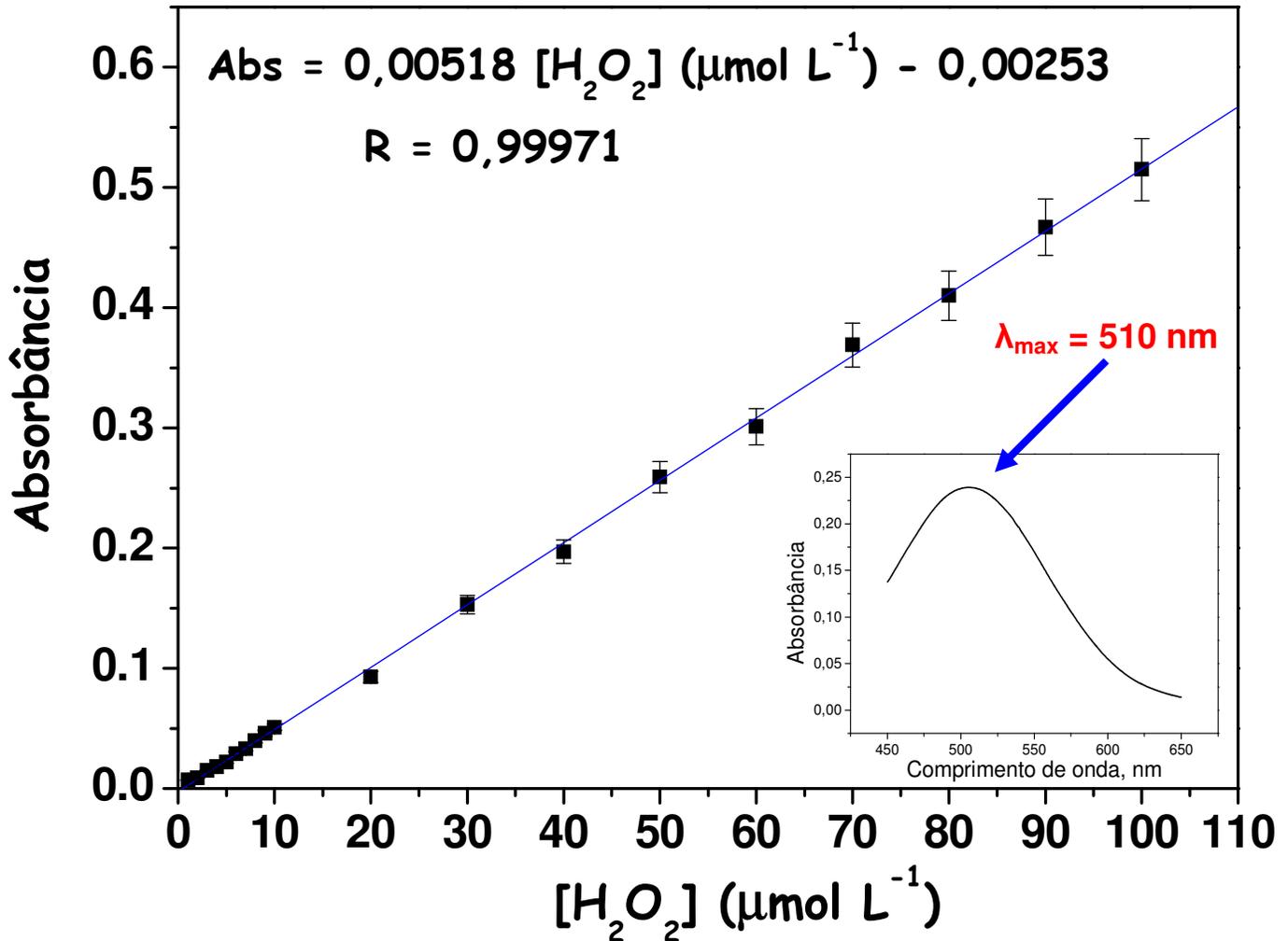


Figura 42: Curva analítica e espectro de absorção para determinação espectrofotométrica de H_2O_2 com concentrações variando de 1,0 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Para a determinação espectrofotométrica de H_2O_2 , os valores encontrados de LD e LQ foram, respectivamente, 0,70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Ficou evidente com a construção da curva analítica que a determinação espectrofotométrica de H_2O_2 apresentou significativa sensibilidade, ampla faixa de linearidade e correlação entre as duas variáveis (absorbância e teor de H_2O_2), além de baixos valores de limites de detecção e quantificação. Tais conclusões reforçam a idéia de confiabilidade da metodologia para determinar as concentrações de peróxido de hidrogênio em amostras de mel.

4.3.9. Quantificação dos Teores de H_2O_2 em Mel e Testes de Recuperação

Uma vez otimizados e estabelecidos os parâmetros analíticos da metodologia espectrofotométrica, fez-se a quantificação do H_2O_2 nas amostras comerciais de mel e procurou-se relacionar os teores com a origem floral e geográfica. Em função de uma matriz de composição complexa e pouco conhecida, o método de adição-padrão foi adotado para a determinação dos teores de H_2O_2 no mel. Na adição-padrão quantidades conhecidas de H_2O_2 são adicionadas às amostras de mel. A partir do aumento do sinal ou absorvância, deduzimos que o analito está presente na amostra a partir de uma resposta linear com a concentração de H_2O_2 .

Na análise das amostras de mel os teores de H_2O_2 foram determinados a partir da construção de curvas de adição-padrão e extrapolação ao eixo das abscissas.

As amostras de mel foram pesadas e diluídas em balões volumétricos de 50,00 mL a fim de se obter uma concentração próxima de 20% (m/v). Sem a necessidade de pré-tratamento e com uma simples filtração em papel de filtro transferiu-se 4 mL desta solução para 5 balões volumétricos de 10,00 mL e foram adicionados padrões de H_2O_2 , sendo o volume final completado com uma solução tampão fosfato pH 7,4.

Os padrões de H_2O_2 foram preparados a partir de uma solução estoque de 10 mmol L⁻¹ e diluídos nos balões volumétricos de 10,00 mL supracitados, exceto no balão 1, nas seguintes proporções (figura 43):

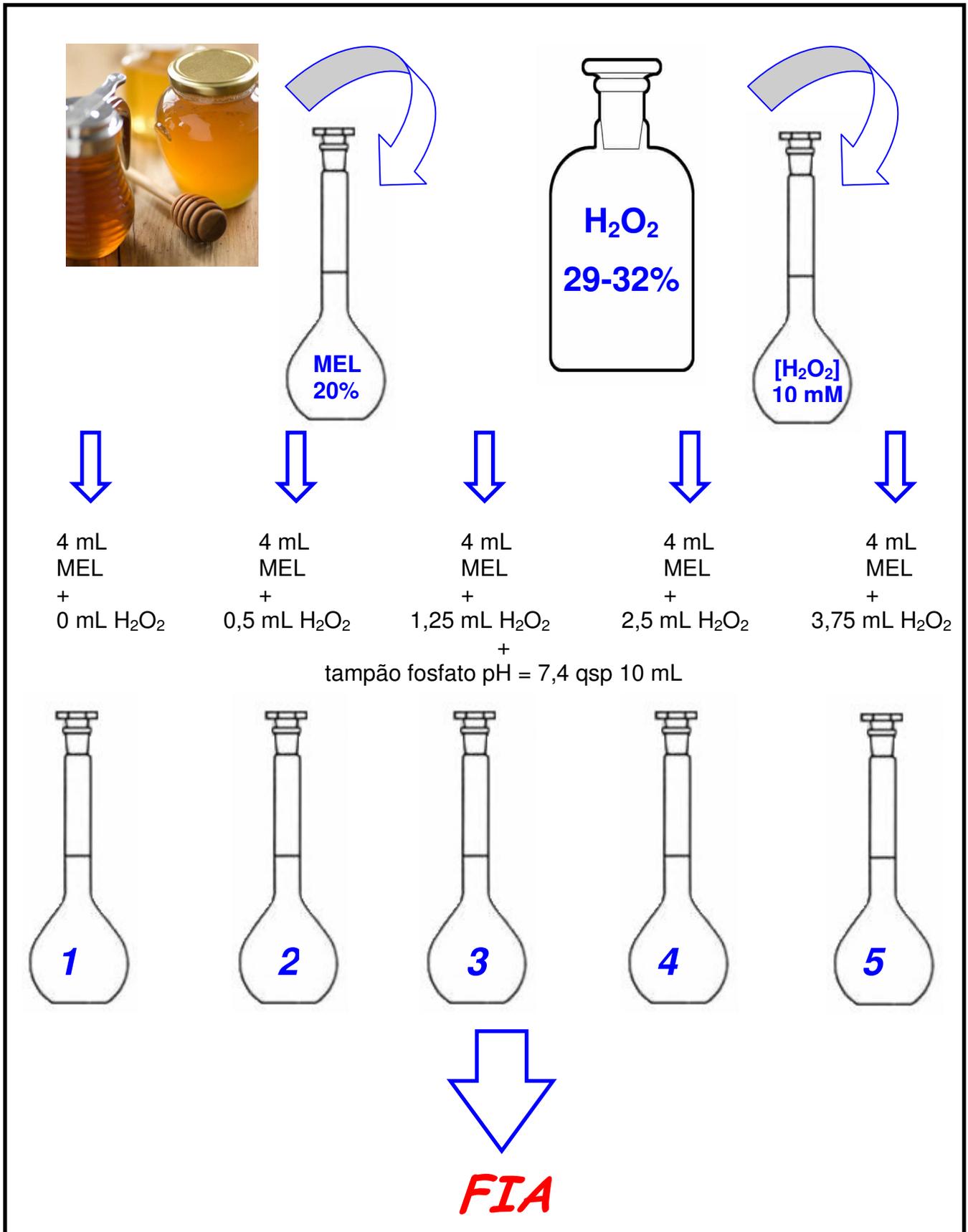


Figura 43: Esquema de diluição das amostras de mel e adição de padrões.

As concentrações dos padrões de H_2O_2 nos balões volumétricos de 10,00 mL com as amostras de mel foram:

- Balão 1: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0 \text{ mmol L}^{-1}$
- Balão 2: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$
- Balão 3: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,25 \text{ mmol L}^{-1}$
- Balão 4: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$
- Balão 5: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 3,75 \text{ mmol L}^{-1}$

A partir desta diluição, 200 μL de cada balão foram amostrados e injetados no sistema em fluxo acoplados aos reatores tubulares contendo a enzima peroxidase e o produto reacional coletado em novos balões volumétricos de 10,00 mL previamente preenchidos com fenol e 4-aminoantipirina. Completou-se o volume do balão com solução tampão fosfato e esperou-se entre 5 e 10 minutos para formação do complexo anti-pirilquinonimina. Por fim, fez-se a leitura das absorbâncias no espectrofotômetro a 510 nm. As concentrações finais de H_2O_2 , para construção da curva de calibração de adição-padrão, foram:

- Balão 1: $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{mel}} = \text{????} \mu\text{mol L}^{-1}$
- Balão 2: $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{mel}} = \text{????} \mu\text{mol L}^{-1} + [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{adição-padrão}} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$
- Balão 3: $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{mel}} = \text{????} \mu\text{mol L}^{-1} + [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{adição-padrão}} = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$
- Balão 4: $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{mel}} = \text{????} \mu\text{mol L}^{-1} + [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{adição-padrão}} = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$
- Balão 5: $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{mel}} = \text{????} \mu\text{mol L}^{-1} + [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{adição-padrão}} = 75 \mu\text{mol L}^{-1}$

Todas as análises foram realizadas em triplicata e a figura 44 ilustra as curvas de adição-padrão para 3 das 17 amostras analisadas.

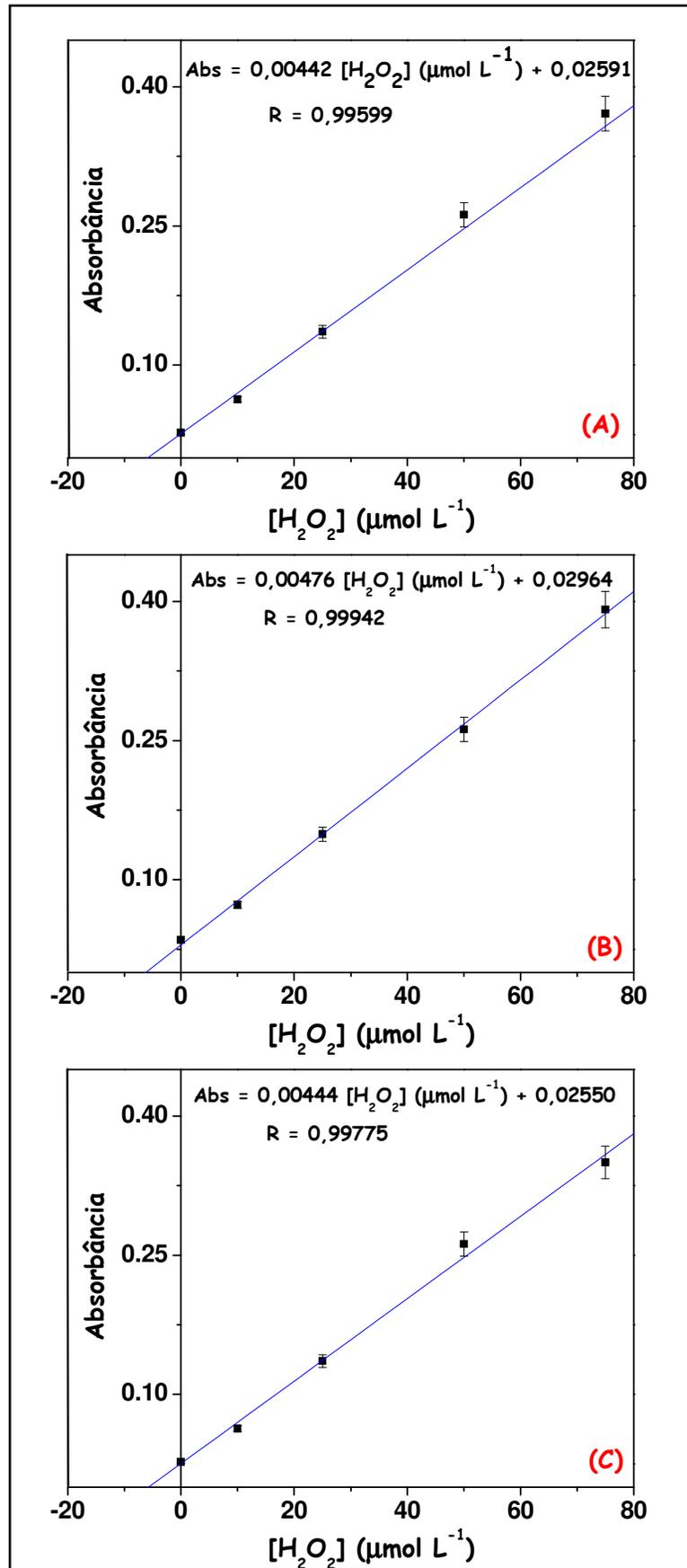


Figura 44: Curvas de calibração de adição-padrão para as amostras de mel (A) Manuka +5, (B) Morrão de Candeia e (C) Silvestre Teresópolis.

Dada à equação da reta:

$$\text{Abs} = b \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] (\mu\text{mol L}^{-1}) + a$$

Onde b = coeficiente angular e a = o valor da absorbância na intersecção da reta com o eixo y , o teor de H_2O_2 nas amostras de mel em $\mu\text{g g}^{-1}$ foi determinado pela seguinte relação matemática:

$$C_{\text{H}_2\text{O}_2 (\mu\text{g g}^{-1})} = \frac{212,5}{m_{\text{mel}}} \cdot \frac{a}{b}$$

m_{mel} é a massa de mel pesada para diluição nos balões volumétricos de 50,00 mL e 212,5 o fator de diluição das amostras.

Os testes de recuperação tiveram como objetivo relacionar o resultado experimental obtido depois da análise de uma amostra fortificada com uma quantidade conhecida do analito e o valor teórico desta quantidade fortificada. A taxa de recuperação foi calculada pela diferença entre a concentração de H_2O_2 presente na amostra fortificada e a concentração de H_2O_2 presente na amostra não fortificada. Este valor foi dividido pela concentração teórica de H_2O_2 adicionado à amostra e foi multiplicada por 100.

Teor de recuperação (%) =

$$\frac{(C_{\text{H}_2\text{O}_2 (\mu\text{mol L}^{-1})} \text{ amostra fortificada} - C_{\text{H}_2\text{O}_2 (\mu\text{mol L}^{-1})} \text{ amostra})}{C_{\text{H}_2\text{O}_2 (\mu\text{mol L}^{-1})} \text{ adicionado à amostra fortificada}} \cdot 100$$

A metodologia utilizada para os testes de recuperação nas amostras foi à mesma descrita na quantificação para o H_2O_2 , isto é a adição padrão, a fim de se evitar o efeito de matriz nas medidas.

A tabela 9 mostra as concentrações de H_2O_2 ($\mu\text{g g}^{-1}$), o intervalo de confiança (μ) para $\alpha = 0,05\%$ ou 95% de confiabilidade, o coeficiente de variância (CV) e o resultado dos testes de recuperação para as medidas espectrofotométricas das 17 amostras de mel.

Tabela 9: Concentrações de H_2O_2 ($\mu\text{g g}^{-1}$), intervalos de confiança ($\alpha = 0,05\%$), coeficientes de variância (CV) e o resultado dos testes de recuperação para as medidas espectrofotométricas das 17 amostras de mel.

Amostra	Origem Botânica / Geográfica	H_2O_2 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	CV (%)	Recuperação (%)
1	Manuka +5 / Nova Zelândia	123,50 \pm 2,30	1,90	93
2	Laranjeira / Japão	32,60 \pm 1,95	2,25	109
3	Rengue / Japão	94,08 \pm 1,88	3,12	82
4	Cassutinga / F.Santana (BA)	47,68 \pm 1,53	4,01	105
5	Velame / Sta Bárbara (MG)	20,46 \pm 1,97	3,35	106
6	Morrão de Candeia / Teresópolis (RJ)	123,89 \pm 6,01	2,25	97
7	Bracatinga / Teresópolis (RJ)	64,98 \pm 3,36	1,98	87
8	Cipó-Uva / Teresópolis (RJ)	51,80 \pm 1,29	4,67	85
9	Laranjeira / Teresópolis (RJ)	4,22 \pm 0,26	7,33	94
10	Laranjeira / Juiz de Fora (MG)	39,78 \pm 1,58	2,28	94
11	Assa Peixe / Teresópolis (RJ)	70,66 \pm 6,01	4,17	94
12	Assa Peixe / Juiz de Fora (MG)	90,52 \pm 3,50	3,89	98
13	Silvestre / Teresópolis (RJ)	120,44 \pm 4,79	7,60	95
14	Silvestre / Viçosa (MG)	150,88 \pm 3,45	2,71	97
15	Eucalipto / Teresópolis (RJ)	206,15 \pm 4,02	5,12	94
16	Eucalipto / Juiz de Fora (MG)	85,54 \pm 3,10	2,00	95
17	Mel Abelha Jataí / Campinas (SP)	199,67 \pm 6,65	4,35	98
Média	-	89,86	3,70	96
V max	-	206,15	7,60	109
V min	-	4,22	1,90	82

4.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia espectrofotométrica para a determinação de H_2O_2 associada ao sistema por injeção em fluxo e o uso de reatores tubulares enzimáticos imobilizados demonstrou ser uma técnica confiável para a quantificação dos teores deste analito nas amostras de mel. A otimização das quantidades de reagentes e os parâmetros das análises foram úteis em termos de economia de material e tempo. Neste contexto, destacou-se a importância da imobilização enzimática em suportes ou resinas como ferramenta eficaz, cada vez mais utilizada quando o objetivo são resultados rápidos, melhoria nas propriedades catalíticas, seletividade, estabilidade, menor manipulação de reagentes e utilização de pequenos volumes das amostras. Neste trabalho, a resina de troca aniônica Amberlite IRA-743 provou ser a mais adequada quando comparada a outras similares, como Amberlite IRA-120 e 400. A rapidez do preparo dos reatores tubulares sem a perda da atividade catalítica da peroxidase imobilizada acelerou o processo de análise frente aos métodos tradicionais, que levariam, no mínimo cerca de 24 horas para o condicionamento enzimático.

A estabilidade enzimática manteve-se constante em 30 injeções consecutivas de H_2O_2 no sistema em fluxo em uma concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Em teores 10 vezes mais elevados de H_2O_2 esta estabilidade reduziu-se a 20 análises. A diminuição da atividade enzimática pode ser explicada pelo alto consumo da POD, visto que a quantidade padrão de enzima fica limitada a um reator tubular com cerca de 250 mg de Amberlite IRA-743, padronizados para o acoplamento ao sistema FIA. Contudo, esta suposta limitação não influenciou nas análises, visto que a faixa de diluição das amostras exibiu concentrações de H_2O_2 entre 10 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, permitindo que um único reator pudesse ser usado em pelo menos 5 determinações consecutivas em triplicata. Estocagem e reutilização dos reatores imobilizados por pelo menos 4 semanas e um eficiente condicionamento das resinas Amberlite IRA-743, sem qualquer comprometimento na sua função, fez com que protocolos fossem desenvolvidos, com um maior controle dos processos operacionais. Os mesmos avaliaram parâmetros como metodologia aplicada, limitações e a manutenção da

atividade enzimática. Tais protocolos foram importantes no andamento da pesquisa, inclusive na imobilização de outras matrizes enzimáticas, como a catalase.

O estudo comprovou que o controle da temperatura foi um fator determinante na manutenção da atividade enzimática. Valores altos levam à desnaturação da peroxidase e a perda de sua atividade catalítica. A investigação da influência de outros compostos que possivelmente poderiam interferir na formação do anti-pirilquinonimina revelou a alta seletividade da reação enzima-substrato e inexistência de reações paralelas, com substâncias comumente encontradas no mel em altas concentrações como a glicose e frutose.

Comprovou-se também que os mini-compressores de ar (bomba de aquário) em combinação com válvulas ou capilares reguladores de vazão constituíram uma alternativa simples, versátil e econômica para impulsionar e aspirar soluções em sistemas de análise em fluxo, que permitiu as determinações em tempo quase que real com pequenos volumes de amostra injetada na ordem de μL . Uma das desvantagens na operação é a necessidade de preenchimento do frasco contendo o eletrólito e o novo ajuste da vazão para manutenção dos parâmetros de análise. Infelizmente, por motivos de ajustes instrumentais, a metodologia de determinação do H_2O_2 não pode ser adaptada para determinações *on line*, por isso a necessidade da coleta do produto reacional em balões volumétricos e uma posterior leitura de absorbância. Mesmo assim tais fatores não comprometeram os resultados e a confiabilidade de todo o processo.

O intervalo de tempo em que as amostras permaneceram diluídas antes de serem submetidas ao sistema em fluxo mostrou uma variação positiva no aumento da formação do H_2O_2 , em algumas amostras estudadas. Este é dos fatores relacionados ao aumento da atividade antimicrobiana do mel em seu fator *peróxido*, porém acredita-se que a vida útil da amostra, sua forma de condicionamento e manipulação possam influenciar nesta atividade. Conseqüentemente, abre-se uma lacuna para futuras pesquisas e investigações deste efeito.

A curva analítica apresentou-se bastante precisa e com elevado grau de concordância entre resultados das análises. A ampla faixa de linearidade da reta (1,0 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e um coeficiente de regressão linear próximo de 1, mostra a boa correlação dos sinais instrumentais com as concentrações de peróxido de hidrogênio,

além da boa sensibilidade da técnica acompanhada de baixos limites de detecção e quantificação, $0,70 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,88 \mu\text{mol L}^{-1}$, isto é, valores inferiores a 1 ppm (= 34mmol L^{-1}). Durante a determinação do teor de H_2O_2 nas amostras de mel os resultados variaram entre $4,22 \mu\text{g g}^{-1}$ (Laranjeira Teresópolis) e $206,15 \mu\text{g g}^{-1}$ (Eucalipto Teresópolis); e valor médio de peróxido de hidrogênio, dos 17 exemplares, em $89,86 \mu\text{g g}^{-1}$. Com coeficientes de variância e recuperação, em média, respectivamente, de 4% e 96% ratificou-se a precisão e a exatidão das determinações. A complexidade da constituição do mel foi determinante na escolha da técnica de adição-padrão tanto para a quantificação dos teores de H_2O_2 quanto para a realização dos testes de recuperação.

**5. DETERMINAÇÃO
AMPEROMÉTRICA
DIFERENCIAL DE PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO EM AMOSTRAS
DE MEL**

5.1. INTRODUÇÃO

Os métodos eletroquímicos de análise do H_2O_2 destacam-se em alguns aspectos aos espectrofotométricos por apresentarem tempo inferior de preparo das amostras, o uso de reagentes menos dispendiosos, sem contar a baixa incidência de espécies interferentes durante sua determinação. As técnicas eletroquímicas demonstram boa seletividade e sensibilidade (limite de detecção da ordem de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$), amplo intervalo de determinação e rápida resposta do eletrodo; além disso, não sofrem interferências em função da coloração das amostras. Normalmente, o princípio da detecção de H_2O_2 é pela oxidação direta em eletrodos de platina, ouro ou carbono, entretanto devido a elevados valores de potencial (algo em torno de 0,3 a 0,6 V vs. Ag/AgCl) aplicados nos eletrodos de trabalho, estes sensores também são susceptíveis a outras espécies eletroativas. Para solucionar este problema, diversos procedimentos de modificações químicas e eletroquímicas nas superfícies dos eletrodos de trabalho têm sido pesquisados. [149]

Mattos et al. (2003) [149] publicaram uma extensa revisão acerca da importância e as principais metodologias envolvidas na determinação do H_2O_2 enfatizando a versatilidade dos métodos eletroquímicos descritos. Exemplos de modificação da superfície de eletrodos como alguns hexacianoferratos de metais de transição, azul da Prússia ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), promovem a redução do oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio em meio ácido. Eletrodos modificados de pasta de carbono, dióxido de titânio, carbono vítreo, ouro e platina também foram citados destacando-se o ganho em sensibilidade na quantificação do H_2O_2 na faixa de ppm. A aplicabilidade das técnicas é ampla, abrangendo as mais diversas matrizes como amostras de águas de chuva, piscinas, efluentes industriais, fluidos biológicos e até *in vivo* em tecidos de roedores [149]. A análise por injeção fluxo associada a sensores amperométricos de ouro eletrodepositados com platina ou paládio é destaque na determinação de glicose no mel, ácido úrico na urina e o próprio H_2O_2 em águas de chuva. No primeiro caso, a glicose é oxidada a ácido glucônico e H_2O_2 a partir de reatores tubulares enzimáticos pela glicose oxidase, onde a concentração de peróxido é proporcional a do carboidrato

presente no alimento. No segundo exemplo, a determinação biológica do ácido úrico é semelhante à metodologia anterior, diferenciando apenas a enzima catalisadora da oxidação do ácido úrico (no caso a uricase que gera também a alantoína). [150, 151, 153, 163]. Em outras publicações empregou-se a catalase imobilizada em membranas a base de polietileno glicol (PEG) sobre sensor sensível a oxigênio ou em biossensores para a determinação do H_2O_2 em formulações farmacêuticas e cosméticos. [149]

Percebe-se, então, a importância do monitoramento e determinação do H_2O_2 em diversos tipos de amostras (matrizes), por isso a necessidade em aprimorar e desenvolver novos procedimentos de quantificação com rapidez, seletividade, sensibilidade e precisão, adequando as técnicas em termos de viabilidade econômica para cada tipo de amostra analisada.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Reagentes e Soluções

Origem, preparação e armazenamento de todas as soluções, obtidas a partir de grau analítico, seguiram como o descrito no item 4.2.1. Excluem-se nesta determinação as soluções de fenol, 4-aminoantipirina, frutose e glicose, utilizadas apenas na determinação espectrofotométrica de H_2O_2 . Solução de KCl 3,0 mol L^{-1} da WTW D-82362 Weilheim, Germany foi usada no eletrodo de referência de $Ag/AgCl_{(sat)}$. Para a eletrodeposição da platina na superfície do eletrodo de ouro foi utilizada uma solução do sal de K_2PtCl_6 (hexacloroplatinato de potássio) à 2,0 mmol L^{-1} em pH 4,8, obtida da Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, USA). O eletrodo de trabalho foi usado por uma semana em análises consecutivas e após este período a platina foi removida através de polimento com auxílio de alumina de 3 e 0,05 μm da Merck®.

5.2.2. Instrumentação

Para a determinação amperométrica do H_2O_2 e demais testes eletroanalíticos foi utilizado um potenciostato/galvanostato $\mu\text{AUTOLAB}$ type III (figura 45). Eletrodo de trabalho de Au da Metrohm® previamente eletrodepositado com Pt, eletrodo de referência $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$, construído pelo grupo de pesquisa, e o contra-eletrodo (eletrodo auxiliar) de aço inoxidável estão descritos na figura 46. O esquema da célula eletroquímica utilizada para eletrodeposição da platina está ilustrado na figura 47.

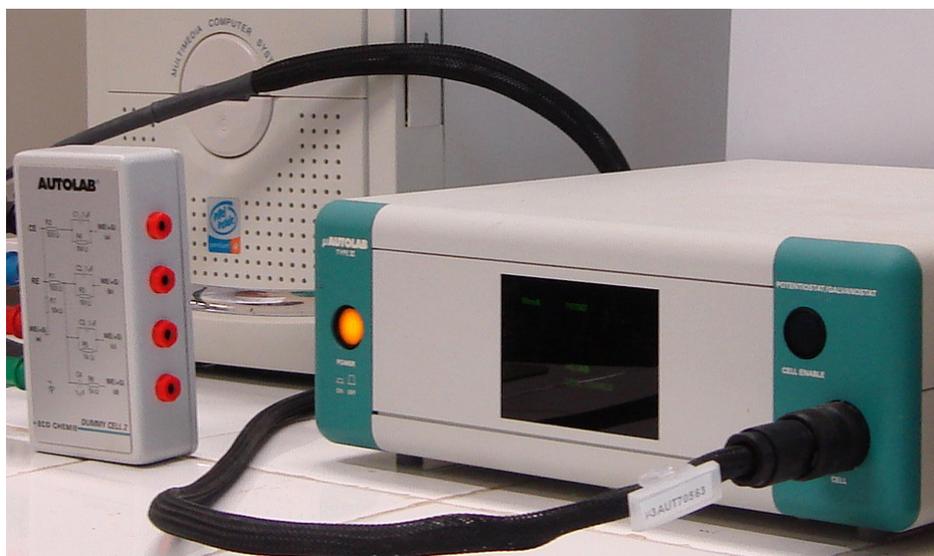


Figura 45: Potenciostato/galvanostato $\mu\text{AUTOLAB}$ type III.

Já a célula eletroquímica do tipo *wall-jet* utilizada para a determinação de H_2O_2 nas amostras de mel (figura 48) constituiu de um frasco de polietileno, onde foram adaptados os eletrodos citados, a fim de interligar o sistema de injeção em fluxo e o potenciostato utilizado para as análises amperométricas (figura 49).

As demais instrumentações foram às mesmas descritas no item 4.2.2 e para o tratamento estatístico dos dados foram utilizados os programas Microcal Origin 7.0 e Microsoft Office Excel 2003.

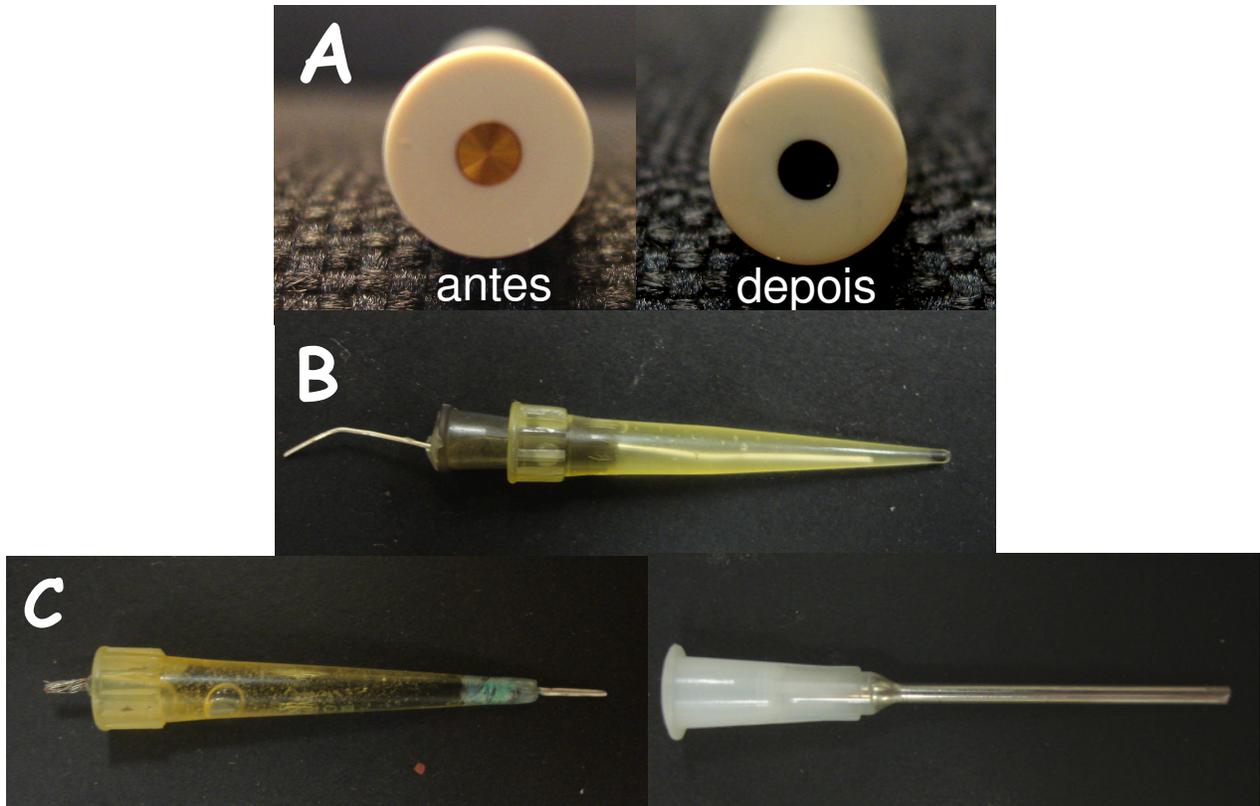


Figura 46: (A) Eletrodo de trabalho de ouro antes e após eletrodeposição de platina em sua superfície, (B) eletrodo de referência ($\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$) e (C) eletrodos auxiliares ou contra-eletrodos (platina e agulha de aço inoxidável).

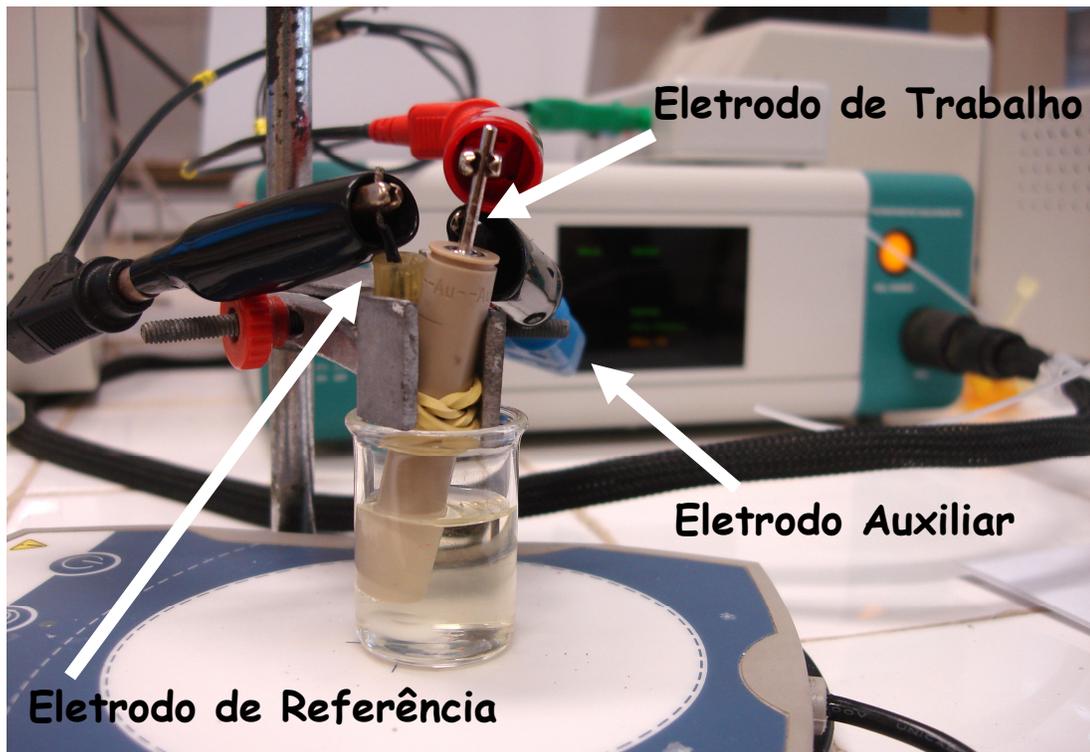


Figura 47: Célula eletroquímica para a eletrodeposição da platina.

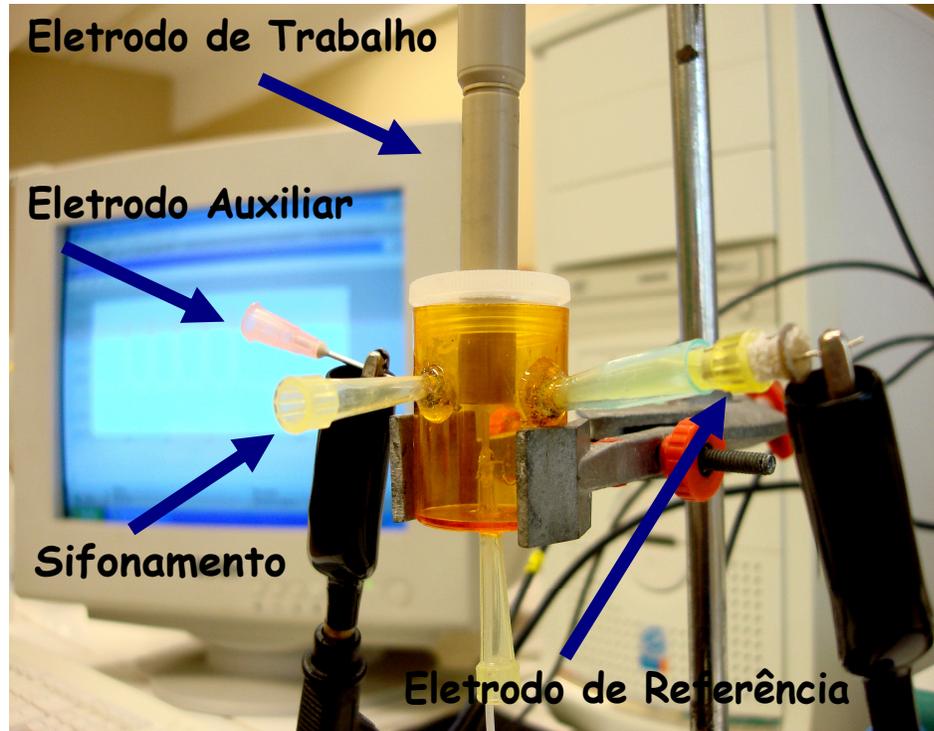


Figura 48: Célula (*wall-jet*) eletroquímica para a determinação amperométrica do H_2O_2 .

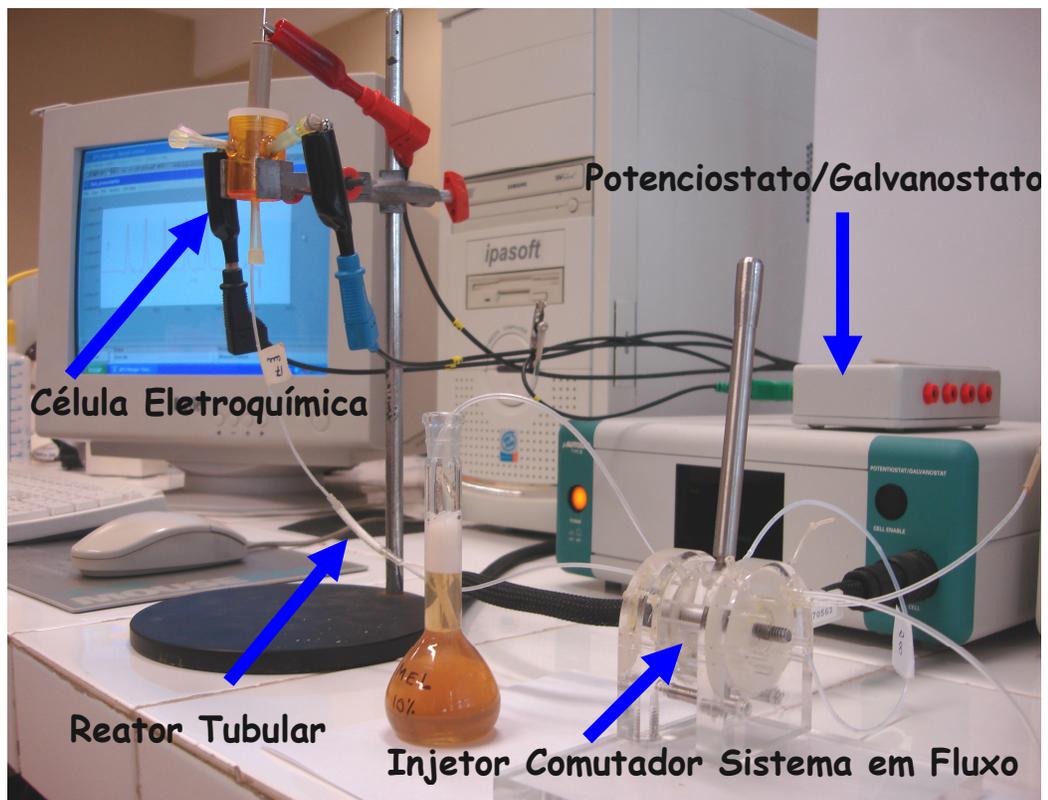


Figura 49: Instrumentação utilizada na determinação amperométrica diferencial do H_2O_2 em amostras de mel.

5.2.3. Sistemas de Injeção em Fluxo Associados aos Reatores Tubulares com Detecção Amperométrica

Para a determinação amperométrica H_2O_2 nas amostras de mel foi utilizado um sistema FIA semelhante ao descrito no item 4.2.4.. A representação esquemática do digrama de fluxo está ilustrada na figura 50 com a detecção amperométrica diferencial feita com auxílio de um potenciostato. De maneira distinta à determinação espectrofotométrica, os registros amperométricos foram obtidos de modo *on-line*.

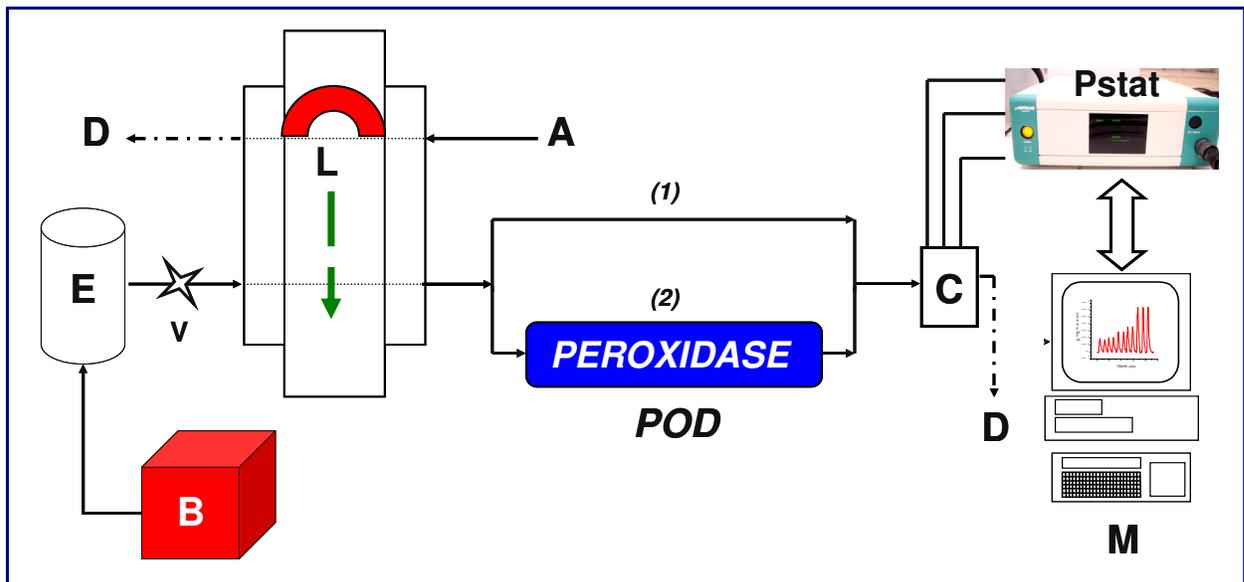


Figura 50: Diagrama esquemático do sistema FIA empregado para determinação de peróxido de hidrogênio. A: amostra, B: bomba de aquário, E: eletrólito (solução tampão fosfato pH 7,4), V: válvula de controle do fluxo, L: *loop* ou alça de amostragem, POD: enzima peroxidase imobilizada em reator tubular, C: célula eletroanalítica, Pstat: potenciostato/galvanostato, M: microcomputador e D: descarte. Na primeira etapa (1) da determinação amperométrica diferencial a amostra ou padrão são injetados sem passar pelo reator tubular. Já na segunda etapa (2) a amostra passa pela peroxidase imobilizada.

5.2.4. Metodologia Analítica

As técnicas eletroanalíticas englobam um grupo de métodos qualitativos e quantitativos e são baseadas no sinal elétrico gerado pela presença de um analito em solução. Têm sido de grande importância no controle dos processos industriais, análise ambiental e em diferentes aplicações na medicina e biotecnologia. Potencial, corrente, concentração e tempo são as principais variáveis monitoradas nessas metodologias com vantagens significativas tais como seletividade, rapidez de resposta, alta sensibilidade e baixo custo. Dentre estas, destaca-se a amperometria, uma técnica voltamétrica em que a informação sobre o analito é obtida através da medida da corrente em função de um potencial fixo, isto é, para um único ponto na curva corrente-potencial. A célula eletroquímica é constituída de três eletrodos imersos em solução contendo o analito e também um excesso de eletrólito não reativo chamado de eletrólito suporte. O potencial elétrico é controlado pelos *eletrodos de trabalho e referência*, enquanto a corrente é monitorada pelos *eletrodos de trabalho e auxiliar*, também chamado de *contra-eletrodo*. [150, 164, 165]

Um sensor químico pode ser considerado um transdutor que responde a um analito através de uma reação química. Seu uso faz necessário para o monitoramento de espécies químicas em tempo real, levado por crescentes necessidades em áreas do meio ambiente e saúde. Baixos limites de detecção, melhoria na precisão e exatidão são preceitos fundamentais e os sensores voltamétricos e amperométricos que monitoram as propriedades elétricas de um analito em solução detém destas características essenciais. Estes sensores são classificados como dinâmicos, pois levam em consideração o fenômeno da interface entre eletrodo e solução, na presença de corrente ou potencial controlado [150]. Como consequência imediata, uma vez compreendendo as reações e os processos nos eletrodos pode-se usar este conhecimento para esquematizar reações de modo a aumentar os fenômenos desejáveis e inibir os indesejáveis, com a mudança do material ou a construção de novos eletrodos e medir a concentração das espécies eletroativas, fazendo uso da seletividade do potencial e do material do eletrodo quando em equilíbrio. [164, 165]

Entretanto, um dos grandes problemas encontrados por diversos pesquisadores está no fato de que mais de uma espécie eletroativa pode responder a certas condições estabelecidas. Assim o uso de microeletrodos, eletrodos modificados e biossensores vêm completar as vantagens dos métodos eletroanalíticos constituindo-se uma ferramenta poderosa para a resolução rápida e confiável de análises de amostras complexas. [150]

Um eletrodo modificado tem sua superfície propositalmente alterada por uma espécie química ativa (ou não). O resultado consiste em bloquear o acesso direto ao eletrodo, inibindo alguns processos e promovendo outros em sua superfície. Esta atribuição e controle de novas propriedades físico-químicas tornam-se uma ajuda importante na seletividade e sensibilidade da análise. Esta modificação pode ser feita em redes de microeletrodos para produzir sensores químicos específicos muito pequenos ou em eletrodos tradicionais com a adição de um modificador de camada, espécie eletroativa que age como mediadora entre a solução e o eletrodo (substrato) na transferência de elétrons (figura 51). [165]

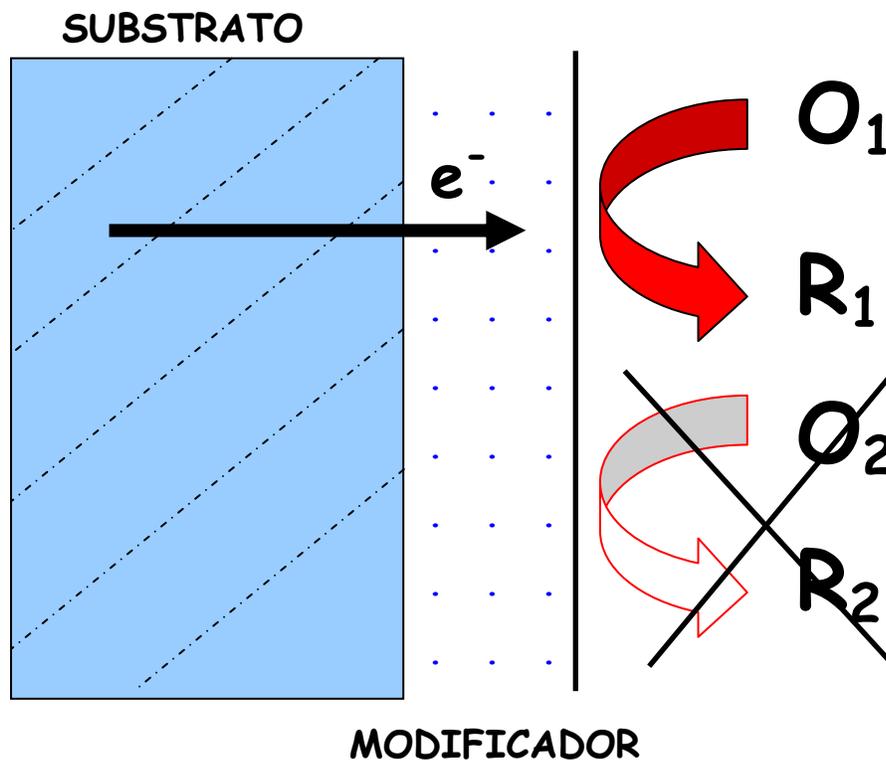


Figura 51: Modelo de funcionamento de um eletrodo com superfície modificada. Neste caso a redução da espécie oxidada O_2 a R_2 fica inibida pelo modificador.

Existem diferentes métodos para a preparação dos diferentes tipos de eletrodos modificados: (A) *Modificação Química*: a espécie eletroativa é imobilizada na superfície do eletrodo por reação química (e.g. silanização), este método tem a tendência de produzir monocamadas, com a exceção da ligação química por polímeros; (B) *Adsorção*: quando uma solução modificadora é colocada sobre o eletrodo. A adsorção pode ser reversível ou irreversível e tem sido usada particularmente na preparação de eletrodos modificados por polímeros (e.g. polivinilpiridina, polivinilferroceno, porfirinas e ftalocianinas); (C) *Eletroadsorção*: a adsorção é efetuada com um potencial aplicado no eletrodo. A quantidade é uma função do tempo de deposição, sendo possível à formação de multicamadas; e (D) *Plasma*: geração de um vapor de átomos a serem ligados na superfície de um eletrodo, formando uma superfície ativada. O carbono é o mais utilizado porque a exposição a aminas ou etenos, por exemplo, resulta na formação de ligações químicas [150, 165].

A caracterização do eletrodo modificado pode ser efetuada por métodos eletroquímicos, espectroscópicos e microscópicos. Dos métodos eletroquímicos realça-se a voltametria cíclica, a cronocoulometria e impedância, que juntos permitem determinar o número de centros ativos redox, a condutividade do filme, a cinética dos processos de eletrodo, dentre outros. Uma das vantagens da utilização dos eletrodos modificados é a origem de correntes mais elevadas do que na ausência do modificador. Às vezes, ao colocar o eletrodo modificado numa solução contendo apenas o eletrólito suporte, observam-se apenas as características voltamétricas das espécies imobilizadas, fato extremamente importante em processos como a eletrocatalise. Em alguns casos pode ser feita a modificação do interior em vez da superfície do eletrodo, como nos eletrodos de pasta de carbono. O modificador, uma substância que reage preferencialmente com uma espécie a ser determinada é misturado com a pasta de carbono. O modo de ação é por catálise da reação ou por pré-concentração do analito na superfície antes da determinação. As aplicações dos eletrodos modificados são as mais diversas, desde a catálise de reações orgânicas e inorgânicas até a transferência eletrônica para moléculas de interesse biológico. [150, 165]

Muitos sensores amperométricos baseados em enzimas estão disponíveis no mercado, como por exemplo, o sensor de glicose para determinação glicêmica no

sangue. Sobre o eletrodo de trabalho é colocado a enzima glicose oxidase que catalisa a oxidação da glicose em ácido glucônico e H_2O_2 , na presença de oxigênio. O peróxido de hidrogênio gerado difunde-se através da superfície do eletrodo e é oxidado para formar oxigênio num potencial constante aplicado em + 0,60 V em relação ao eletrodo de referência ($\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$). A corrente limite é proporcional a concentração de H_2O_2 que por sua vez é proporcional a concentração de glicose no sangue [166, 167].



É com base neste princípio que o teor de H_2O_2 nas amostras de mel foi determinado na presença da enzima peroxidase, imobilizada em resina em um reator tubular acoplada a um sistema de análise em fluxo. Os procedimentos de imobilização e o sistema FIA associado aos detectores amperométricos foram descritos nos itens 4.2.3. e 5.2.3, respectivamente.

A medida amperométrica diferencial requer no mínimo 3 determinações:

\dot{I}_A : Injeção da amostra + padrão de H_2O_2 no sistema sem a enzima peroxidase imobilizada;

\dot{I}_B : Injeção da amostra no sistema sem a enzima peroxidase imobilizada;

\dot{I}_C : Injeção da amostra no sistema com a enzima peroxidase imobilizada.

No primeiro caso o sinal registrado corresponde ao padrão de $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ presente no mel + possíveis interferentes presentes na amostra. No segundo caso o sinal corresponde H_2O_2 presente no mel + possíveis interferentes presentes na amostra. No terceiro caso o sinal representa a amostra sem o H_2O_2 e somente as possíveis espécies interferentes.

A diferença entre o primeiro e segundo sinal ($i_A - i_B$) corresponde a corrente equivalente à concentração de H_2O_2 padrão adicionado para cada amostra de mel. Como se sabe a concentração deste padrão calcula-se então a constante k . Mantendo-se as mesmas condições de análise a diferença entre o segundo e o terceiro sinal ($i_B -$

i_c) corresponde a corrente equivalente à concentração de H_2O_2 em cada amostra de mel, utilizando-se a constante k calculada anteriormente.

Para os registros amperométricos, um eletrodo de ouro (trabalho) foi modificado por eletrodeposição de platina presente numa solução de K_2PtCl_6 ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e pH 4,8) num potencial de $-1,00 \text{ V}$ por um tempo de 15 minutos [150, 151, 163, 168, 169]. Momentos antes de realizar a modificação da superfície, o eletrodo de ouro foi polido com alumina de 3 e $0,05 \text{ }\mu\text{m}$. Os eletrodos após a modificação se mostraram estáveis por pelo menos uma semana de uso. Como eletrodo de referência foi usado um eletrodo miniaturizado de $Ag/AgCl_{(sat)}$ construído em laboratório e como eletrodo auxiliar foi usado uma agulha de aço inoxidável.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.3.1. Estudo do Volume de Injeção (Alça de amostragem)

Neste experimento procurou-se determinar o volume ideal de amostra a ser injetada no sistema em fluxo para obter a maior sensibilidade da corrente de oxidação para o H_2O_2 .

Solução de H_2O_2 $10 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ foi preparada em balão de $25,00 \text{ mL}$, para as injeções no sistema em fluxo. Eletrodos de $Ag/AgCl_{(sat)}$, Au eletrodepositado com Pt e aço-inoxidável, foram selecionados como eletrodos de referência, trabalho e auxiliar, respectivamente. Um potencial de trabalho fixado em $+0,60 \text{ V}$, uma vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ juntamente com uma solução carreadora de tampão fosfato pH 7,4 completaram as condições de análise. O estudo da melhor vazão será descrito no próximo item. Cinco volumes de injeção foram escolhidos para o experimento entre $50 \text{ }\mu\text{L}$ e $250 \text{ }\mu\text{L}$ (figura 52).

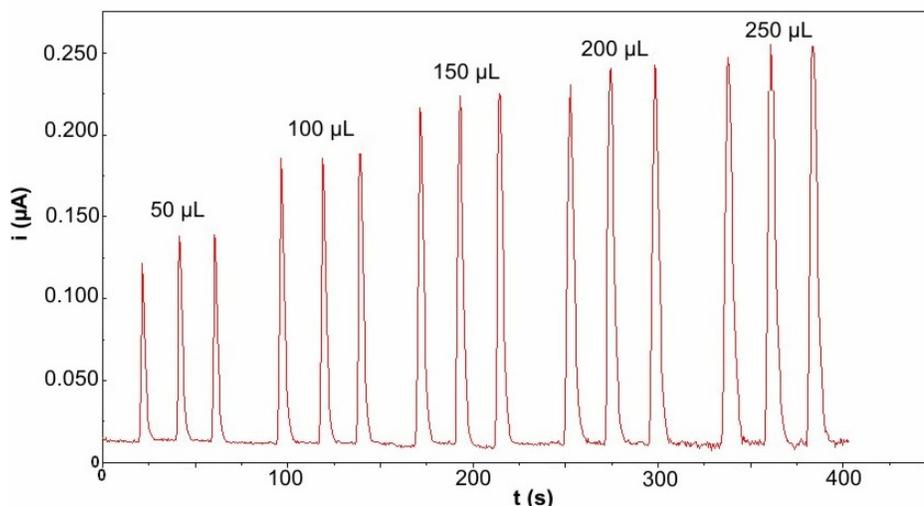


Figura 52: Registros amperométricos do volume de injeção para concentrações de H_2O_2 a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Dados: Vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; percurso analítico 53 cm ; solução tampão fosfato pH $7,4$ e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

Observou-se que a partir do volume de $150 \mu\text{L}$ até $250 \mu\text{L}$, não houve crescimento significativo da corrente de oxidação para o H_2O_2 (figura 53). Portanto, um volume de $200 \mu\text{L}$ foi escolhido para os demais estudos, uma vez que apresentou baixa dispersão dos sinais e um elevado valor de corrente. Os CVs para os volumes de injeção na seqüência anterior registraram, respectivamente, valores de: 5%, 1%, 4%, 4% e 3%.

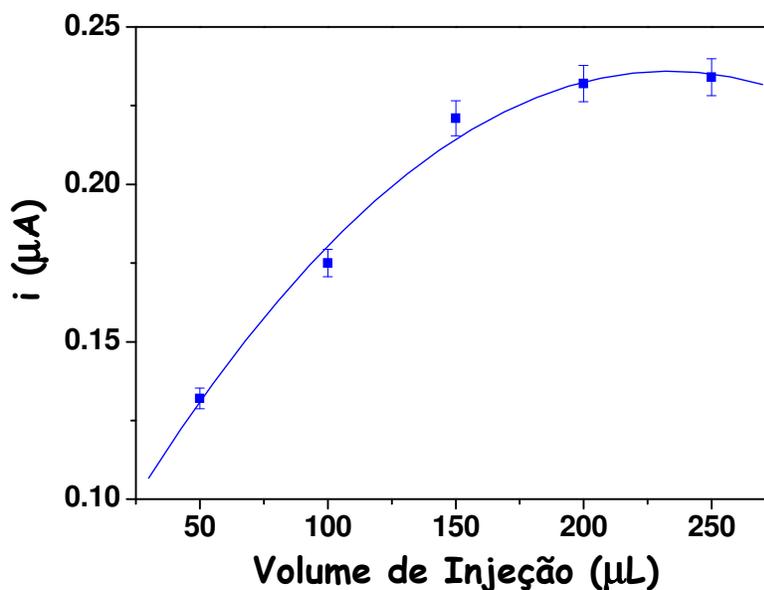


Figura 53: Variação da corrente de oxidação para $\text{H}_2\text{O}_2 = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em função do volume da amostra injetada no sistema FIA. Dados: Vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, percurso analítico 53 cm , solução tampão fosfato pH $7,4$ e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$,

5.3.2. Estudo da Vazão na Presença ou Ausência do Reator Enzimático

O estudo da vazão, sem dúvida é um dos principais fatores que influenciam na análise por injeção em fluxo, especialmente por determinar o período de tempo de permanência da amostra no sistema, a frequência analítica, os sinais transientes e perfil dos diagramas obtidos. Vazões muito baixas produzem registros amperométricos dispersos, impedância hidrodinâmica, imprecisão nas análises e resultados pouco confiáveis. Por outro lado, vazões elevadas, apesar de obter sinais transientes máximos, consomem muito eletrólito e fluido carreador, ocasionando gastos excessivos.

No primeiro experimento, várias vazões foram estudadas com o intuito de escolher a vazão que apresenta maior sensibilidade, versatilidade, simplicidade, economia no consumo de reagentes e amostras e rapidez para a determinação amperométrica do H_2O_2 na ausência do reator tubular enzimático. Por tratar-se de propulsores tipo bomba de aquário, o controle da vazão foi feito ajustando a válvula de fluxo (figuras 20 e 50). A figura 54 mostra que para as vazões muito baixas como $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ e $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ os sinais transientes de oxidação do H_2O_2 apresentaram-se dispersos e baixos. Em valores intermediários que variaram entre $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e $4,5 \text{ mL min}^{-1}$ a corrente de oxidação aumentou e manteve-se praticamente constante e pouco dispersa. Já em vazões elevadas de $7,5 \text{ mL min}^{-1}$ e $14,0 \text{ mL min}^{-1}$ as correntes alcançaram os maiores valores, entretanto utilizá-los para tal metodologia torna-se inviável em função do grande consumo de eletrólito carreador pelo sistema. Conforme os resultados obtidos, a vazão selecionada para a metodologia foi de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Os CVs das análises foram inferiores à 5%.

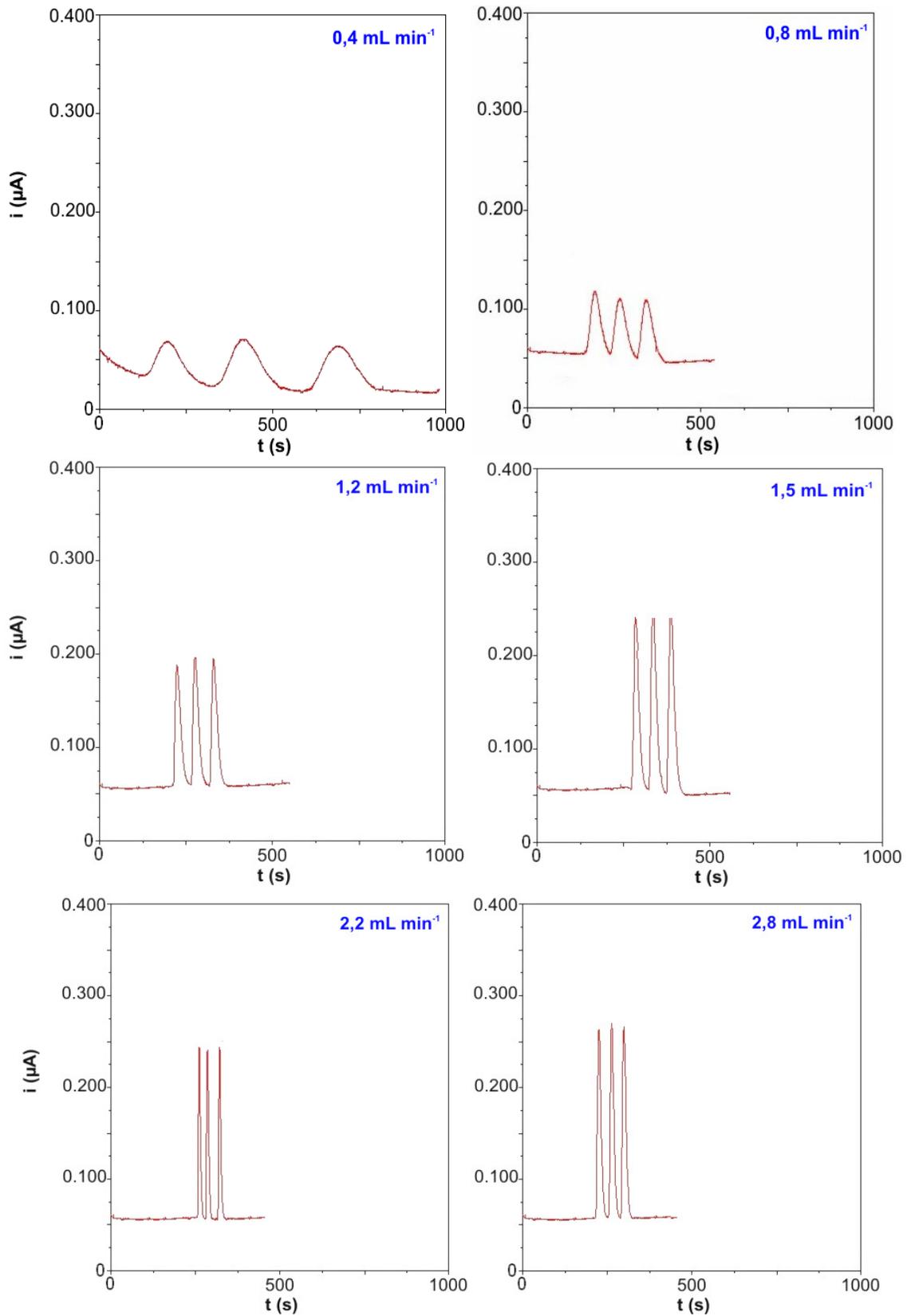


Figura 54: Estudo da vazão no sistema amperométrico para determinação de H_2O_2 . Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, percurso analítico 53 cm , solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

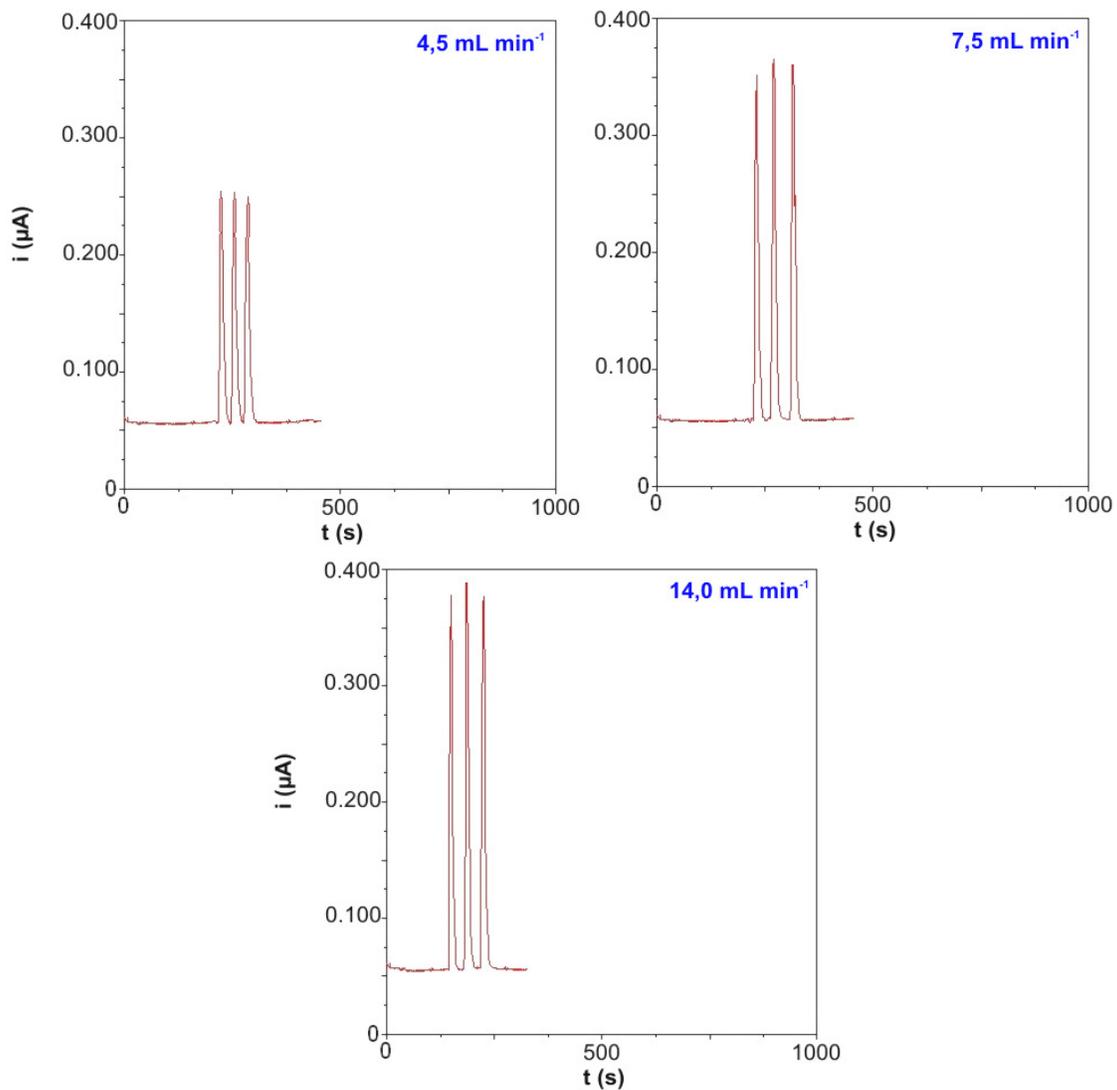


Figura 54: continuação

A impedância hidrodinâmica é influenciada pela presença do reator tubular imobilizado acoplado ao sistema FIA. Ele, por estar preenchido com microesferas de resina Amberlite IRA-743 e conectado pelas extremidades com algodão e tubos de polietileno, apresenta-se como uma fonte de resistência ao fluxo natural do eletrólito carreador. O segundo experimento mostrou a capacidade do reator enzimático imobilizado com a peroxidase para consumir H_2O_2 em função da variação da vazão e da concentração do analito. Além de determinar o melhor fluxo, este teve o objetivo de exibir qual a concentração ideal de H_2O_2 a ser adicionada ao mel na amperometria diferencial.

No primeiro teste foi utilizado uma vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ e duas concentrações de H_2O_2 foram injetadas: $2,0$ e $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ com um volume de injeção de $200 \mu\text{L}$ e potencial aplicado $+0,60\text{V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. De acordo com a figura 55, o experimento mostrou que para as concentrações estudadas na vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$, a enzima peroxidase não oxidou todo o H_2O_2 . No segundo teste a vazão foi reduzida a $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ e revelou-se satisfatória para todo consumo de H_2O_2 , pela peroxidase na concentração de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (figura 56). Estabeleceu-se então, que para a quantificação de peróxido de hidrogênio nas amostras de mel, seria utilizada uma concentração padrão de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 a ser adicionada na determinação diferencial com uma vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Mais uma vez a precisão e os CVs foram inferiores a 5% e revelaram a boa repetibilidade da técnica.

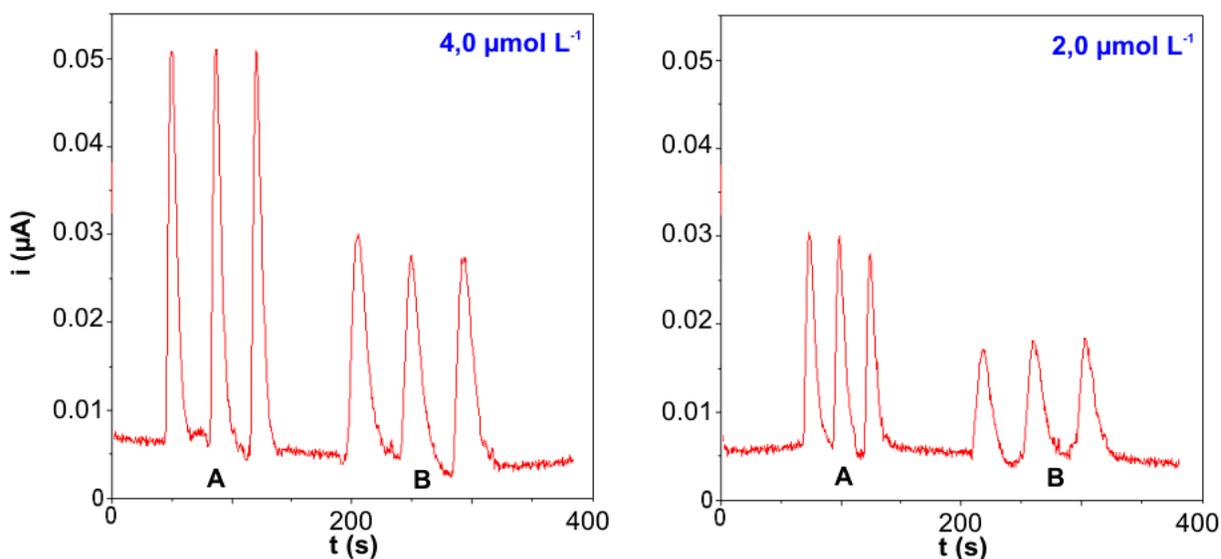


Figura 55: Estudo da vazão e registro amperométrico no sistema em fluxo na presença do reator enzimático. Dados: vazão $3,0 \text{ mL min}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (A): passagem do H_2O_2 sem o reator tubular com POD imobilizada, (B) passagem do H_2O_2 pelo reator tubular com POD imobilizada, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, percurso analítico 53 cm , solução tampão fosfato pH $7,4$ e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

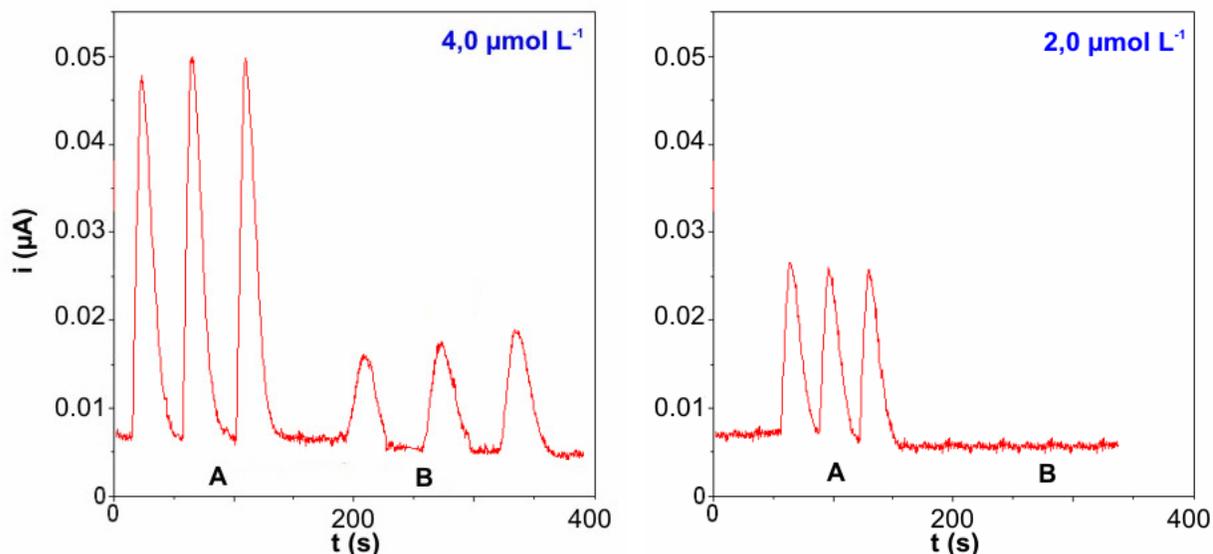


Figura 56: Estudo da vazão e registro amperométrico no sistema em fluxo na presença do reator enzimático. Dados: vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (A): passagem do H_2O_2 sem o reator tubular com POD imobilizada, (B) passagem do H_2O_2 pelo reator tubular com POD imobilizada, volume de injeção $200 \text{ } \mu\text{L}$, percurso analítico 53 cm , solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$

5.3.3. Estudo da Atividade Enzimática em Diferentes Vazões e Concentrações de H_2O_2

Em complemento ao item anterior, outros estudos foram feitos em referência a manutenção da atividade enzimática da peroxidase frente a outras vazões e concentrações de H_2O_2 , em valores percentuais. A figura 57 mostra o poder de consumo da peroxidase no reator enzimático em variações da concentração de H_2O_2 de $1,0$ a $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, percurso analítico de 53 cm e potencial aplicado de $+0,60 \text{ V Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. O estudo comprovou que para esta vazão, o reator consegue consumir todo o H_2O_2 até a concentração de $2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, havendo um decréscimo da atividade catalítica da peroxidase com o aumento da concentração de H_2O_2 restando apenas a 30% quando esta é de $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. O estudo ratificou o

investigado na parte final do item anterior (figuras 55 e 56) elegendo a concentração de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 como a ideal para os testes amperométricos.

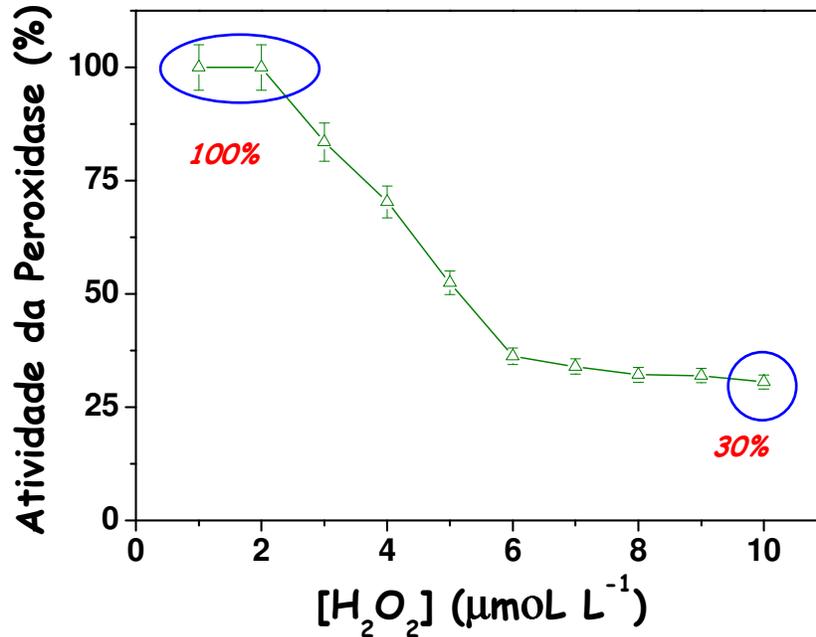


Figura 57: Estudo da manutenção da atividade enzimática em diferentes concentrações de H_2O_2 . Dados: vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, percurso analítico 53 cm, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. Em destaque (círculos azuis) as maiores e menores porcentagens de consumo para as referentes concentrações de $1,0$ - $2,0$ e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 , respectivamente.

Estudo semelhante foi feito confrontando valores de vazão do sistema FIA, concentração de H_2O_2 a $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e atividade de consumo da peroxidase. Tal estudo teve como objetivo comprovar a melhor taxa de vazão para uma atividade catalítica próxima, senão igual a 100% de peroxidase imobilizada na Amberlite IRA-743. O poder de consumo enzimático frente a vazões de $0,8$; $1,5$; $2,8$; $3,7$ e $4,5 \text{ mL min}^{-1}$ comprovou que na vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ a peroxidase conseguiu consumir 100% do H_2O_2 (figura 58). Verificou-se que em fluxos mais intensos, a enzima não consegue consumir com eficiência todo o H_2O_2 injetado, fato este que se deve muito provavelmente ao comprimento limitado do reator tubular enzimático.

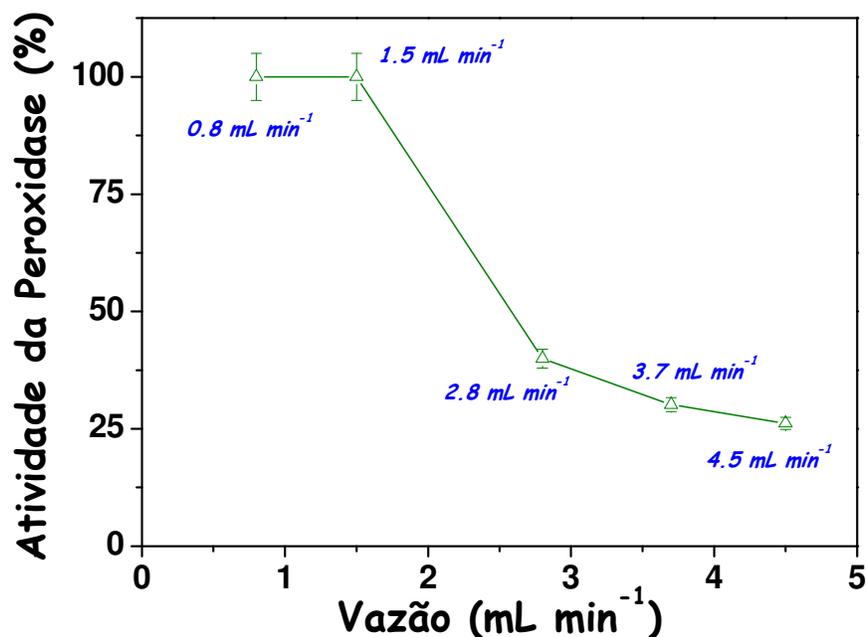


Figura 58: Estudo da manutenção da atividade enzimática em diferentes vazões submetidas no sistema FIA. Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, percurso analítico 53 cm, volume de injeção 200 μL , solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado +0,60 V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$.

5.3.4. Estudo do Percurso Analítico

Outro fator que influencia na dispersão dos sinais transientes e sensibilidade das análises é o comprimento do caminho percorrido pela amostra desde o ponto de injeção até a célula eletroquímica. Percursos analíticos extensos aumentam o tempo de residência da amostra no sistema e originam picos de oxidação alargados com baixa precisão nas análises. O teste a seguir descreveu as variações dos sinais transientes de oxidação do H_2O_2 do ponto de injeção da amostra até o eletrodo indicador. Para este estudo foi escolhido um volume de injeção de 200 μL , padrão de H_2O_2 a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para as injeções em fluxo com um potencial aplicado ao eletrodo de referência de +0,60V $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$. A figura 59 mostra a variação da corrente frente a seis comprimentos do percurso analítico: 36 cm, 41 cm, 53 cm, 66 cm, 85 cm e 126 cm. Tubos e conectores longos no sistema FIA também diminuem a frequência analítica das

medidas. Conforme o estudo, menores valores do percurso analítico representam maiores sinais de oxidação de H_2O_2 . Com o aumento do mesmo há uma tendência da diminuição do fluxo laminar e uma maior dispersão da amostra, verificado na distância de 126 cm. O percurso analítico escolhido no trabalho foi de 53 cm, por apresentar menor dispersão e uma boa sensibilidade para as análises. Os CVs foram inferiores a 3% nas medidas amperométricas.

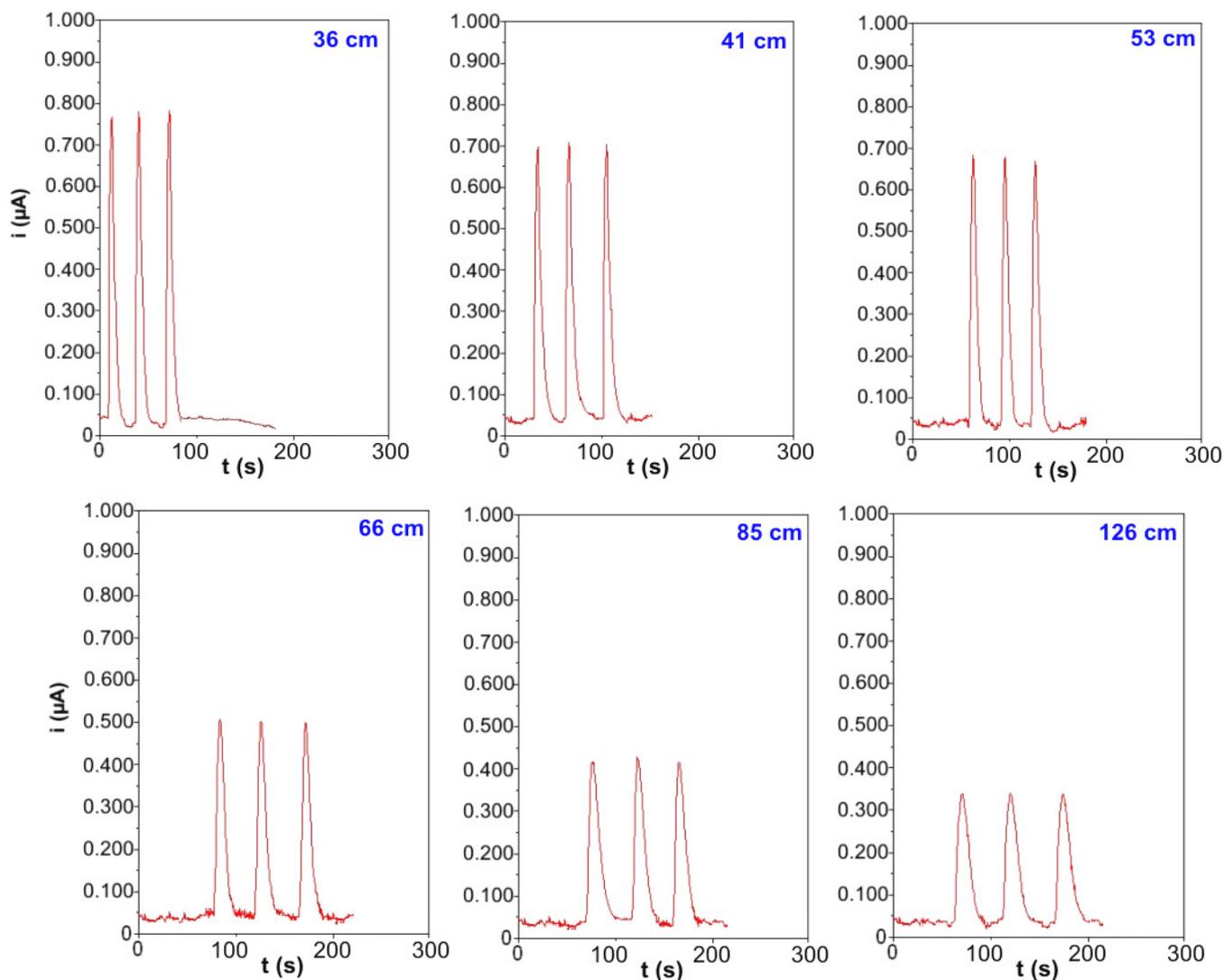


Figura 59: Avaliação dos registros amperométricos em função do comprimento do percurso analítico. Dados: vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção $200 \mu\text{L}$; solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

5.3.5. Testes de Repetibilidade

Os testes de repetibilidade avaliam o grau de concordância entre resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises de uma mesma amostra, em idênticas condições de teste. Esse tipo de estudo verifica a robustez da metodologia, isto é, a capacidade de um método de não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros e a seletividade da técnica ou a interferência de outra substância, que não seja o analito de interesse, na medição pelo detector.

A figura 60 mostra a resposta instrumental para 3 injeções no sistema FIA, seguindo o proposto pela metodologia amperométrica diferencial: (I) mel em concentração aproximada de 10% (m/v) + padrão de H_2O_2 a $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sem a passagem pelo reator tubular; (II) mel em concentração aproximada de 10% (m/v) sem a passagem pelo reator tubular e (III) mel em concentração aproximada de 10% (m/v) com a passagem pelo reator tubular imobilizado com a peroxidase. A amostra selecionada foi a número 1 (Manuka +5) diluída em balões volumétricos de 25,00 mL, volume de injeção 200 μL , percurso analítico 53 cm, vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, solução tampão fosfato pH 7,4 como eletrólito carreador e potencial aplicado + 0,60 V vs $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$. Em sequências de 10 injeções/etapa, os CVs registrados foram de 5%, 3% e 4%, respectivamente. Excelente repetibilidade foi alcançada, mostrando a robustez da técnica na determinação de peróxido de hidrogênio em amostras de mel, mesmo tratando-se de matrizes complexas.

Teste paralelo foi realizado com a mesma amostra, porém em outras diluições diferentes, 2% e 5% (m/v). Resultados semelhantes foram obtidos confirmando a repetibilidade e robustez do estudo, mesmo em concentrações menores da amostra (figura 61). Em todas estas análises os CVs não ultrapassaram 5%.

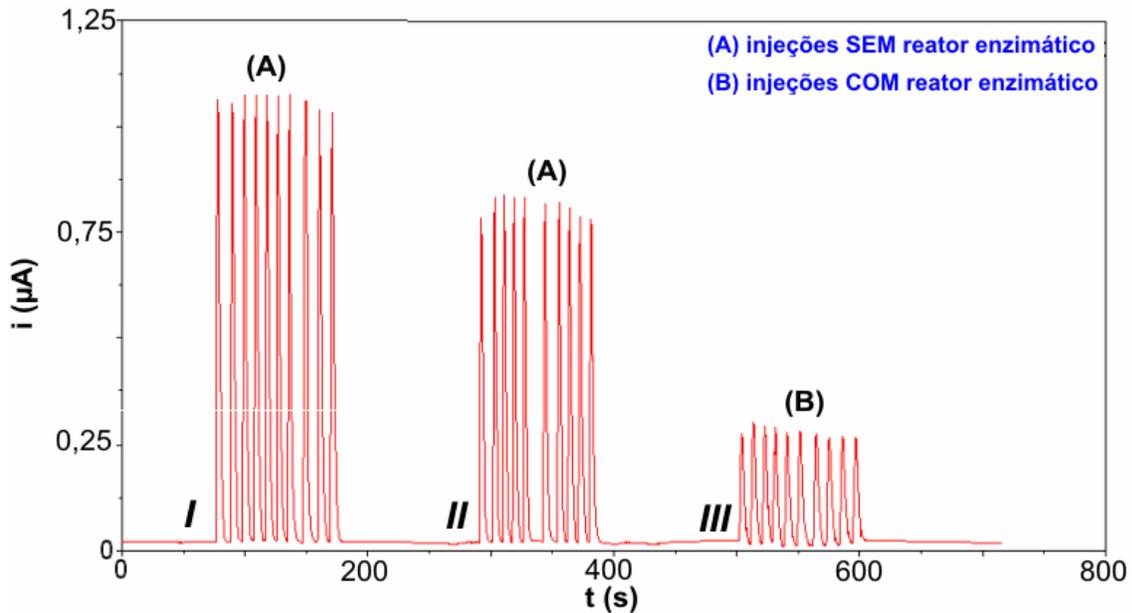


Figura 60: Seqüência de injeções sucessivas no sistema em fluxo: (I) mel Manuka +5, 10% (m/v) + padrões de H_2O_2 a $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; (II) mel Manuka +5, 10% (m/v), (III) mel Manuka +5, 10% (m/v). (A) sistema FIA sem reator enzimático e (B) sistema FIA com reator enzimático. Dados: vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, percurso analítico 53 cm, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

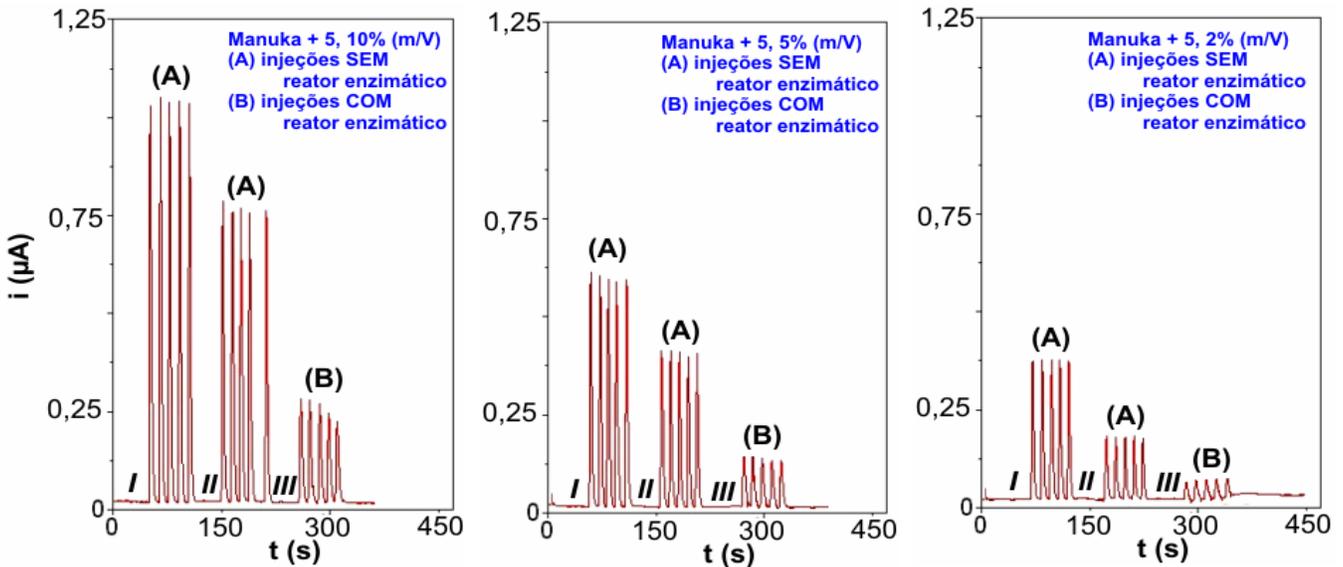


Figura 61: Seqüência de injeções sucessivas no sistema em fluxo. Da esquerda pra direita: Manuka +5, 10%, 5% e 2% (m/v). (I) mel + padrões de H_2O_2 a $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (II) mel, (III) mel Manuka +5. (A) sistema FIA sem reator enzimático e (B) sistema FIA com reator enzimático. Dados: vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, percurso analítico 53 cm, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

5.3.6. Curva Analítica

A curva analítica, além de validar a sensibilidade e confiabilidade do método, tem como objetivo mostrar a correlação linear entre a corrente limite de oxidação do H_2O_2 e sua concentração, de modo que se torne possível a determinação amperométrica diferencial do H_2O_2 nas amostras de mel. Após conhecer os principais parâmetros do sistema em fluxo, uma curva analítica foi construída onde as concentrações de H_2O_2 variaram de 0,5 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A curva apresentou ótima sensibilidade analítica, obtendo limites de detecção, LD ($s_b + 3s$) e quantificação, LQ ($s_b + 10s$), calculados em função da linha base na ausência do analito, respectivamente de 0,29 e 0,38 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A figura 62 mostra os registros amperométricos em triplicata em função da variação dos padrões de H_2O_2 injetados no sistema em fluxo. A simetria das medidas verificada pela resolução dos picos no diagrama indicou que o detector eletroquímico manteve sua performance constante, não se observando qualquer efeito de alargamento da banda ou aparecimento de cauda. Estes resultados indicam que o detector não apresenta efeitos de residência ou de memória, e que a célula eletroquímica proposta neste trabalho pode ser utilizada como detector amperométrico para sistemas de análise em fluxo. Dentre as vantagens, a alta estabilidade e elevada sensibilidade na resposta do detector permitiram que o H_2O_2 fosse monitorados de forma rápida e precisa.

A figura 63 mostra a curva analítica obtida para os padrões de H_2O_2 variando entre 0,5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a qual apresentou um coeficiente de correlação igual a 0,9989, demonstrando a ampla faixa de linearidade do método.

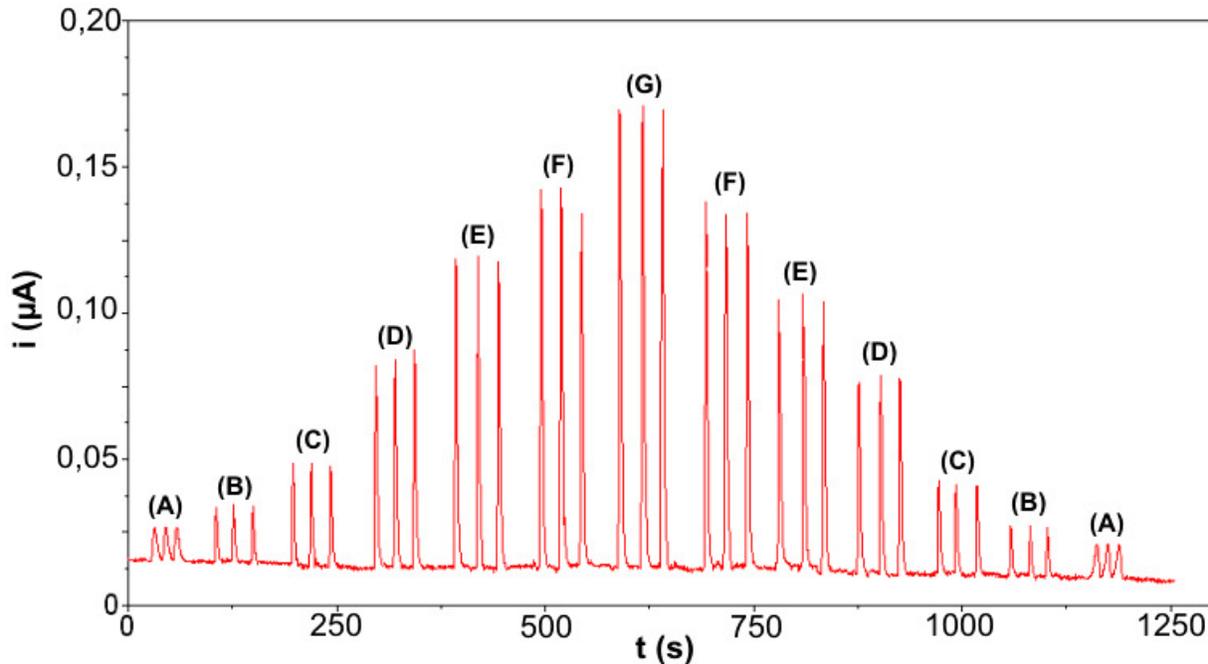


Figura 62: Injeções repetitivas de padrões de H_2O_2 contendo: (A) 0,5, (B) 1,0, (C) 2,0, (D) 4,0, (E) 6,0, (F) 8,0 e (G) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Dados: vazão 1,5 mL min^{-1} , percurso analítico 53 cm, volume de injeção 200 μL , solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado +0,60 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

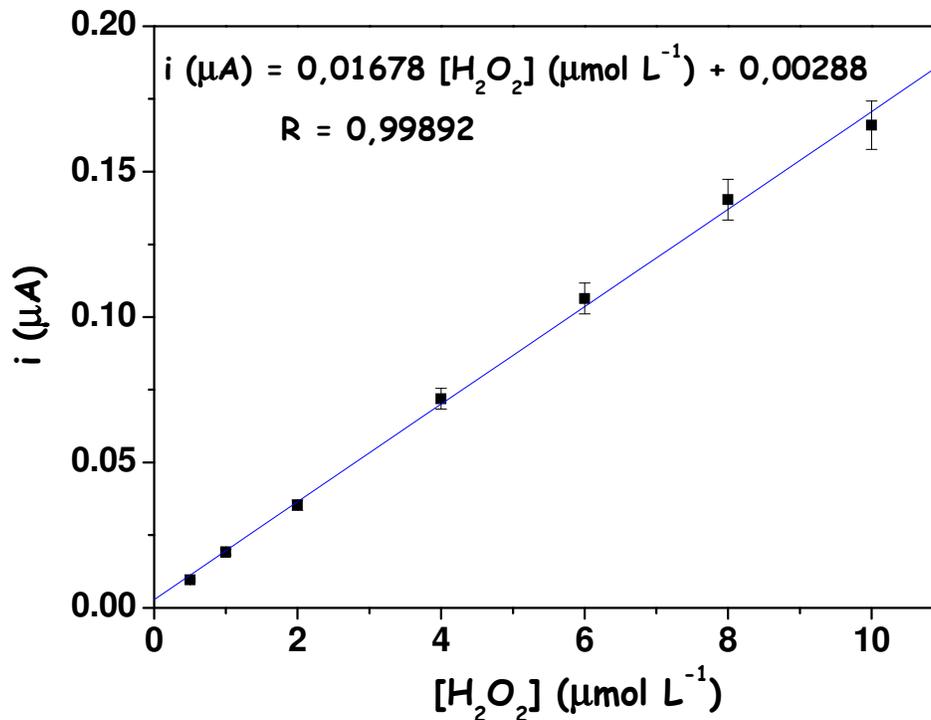


Figura 63: Curva analítica para determinação amperométrica de H_2O_2 com concentrações variando entre 0,5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

5.3.7. Quantificação dos Teores de H_2O_2 em Amostras de Mel e Testes de Recuperação

Uma vez otimizados os parâmetros FIA foram determinados os teores de H_2O_2 nas amostras por amperometria diferencial. Solução padrão estoque de H_2O_2 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi preparada em um balão volumétrico de 50,00 mL. Todos os exemplares de mel foram diluídos em 2 balões de 25,00 mL alcançando uma concentração aproximada de 10 % (m/v). A um destes frascos 500 μL de H_2O_2 padrão foram adicionados, obtendo-se uma concentração final de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e completou-se o volume até o menisco com solução tampão fosfato. Ao outro frasco, diluição direta com eletrólito foi realizada para a massa referida de mel. O único tratamento das amostras de mel, como citado na determinação espectrofotométrica, foi uma simples filtração em papel de filtro e as condições analíticas estabelecidas nos estudos anteriores: 200 μL de volume de injeção, vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, 53 cm percurso analítico, solução tampão fosfato pH 7,4 como fluido carreador e potencial aplicado $+0,60\text{V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

Na primeira etapa da análise injetou-se, separadamente, o conteúdo dos dois balões de diluição do mel sem o reator tubular e registraram-se os diagramas. Na segunda etapa, injetou-se apenas o segundo balão de diluição do mel, isto é, sem a presença do padrão de H_2O_2 , submetendo-o a passagem pelo reator tubular com a enzima peroxidase imobilizada. Da mesma maneira anterior mediu-se a intensidade da corrente de oxidação gerada. Conforme descrito, no item 5.2.4., calcularam-se as concentrações de H_2O_2 das 17 amostras comerciais de mel de forma diferencial, levando em conta as diluições utilizadas.

Alguns diagramas das análises estão ilustrados na figura 64. Destaca-se os registros amperométricos de 3 amostras de mel (Manuka +5, Eucalipto Teresópolis e Mel de Abelha Jataí) analisadas na pesquisa, onde se representam: I) $[\text{Mel}] = 10\% \text{ (m/v)} + [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{padrão}} = 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, II) $[\text{Mel}] = 10\% \text{ (m/v)}$, III) $[\text{Mel}] = 10\% \text{ (m/v)}$, (A) Sem a passagem da amostra pelo reator tubular e B) Com a passagem da amostra pelo reator tubular.

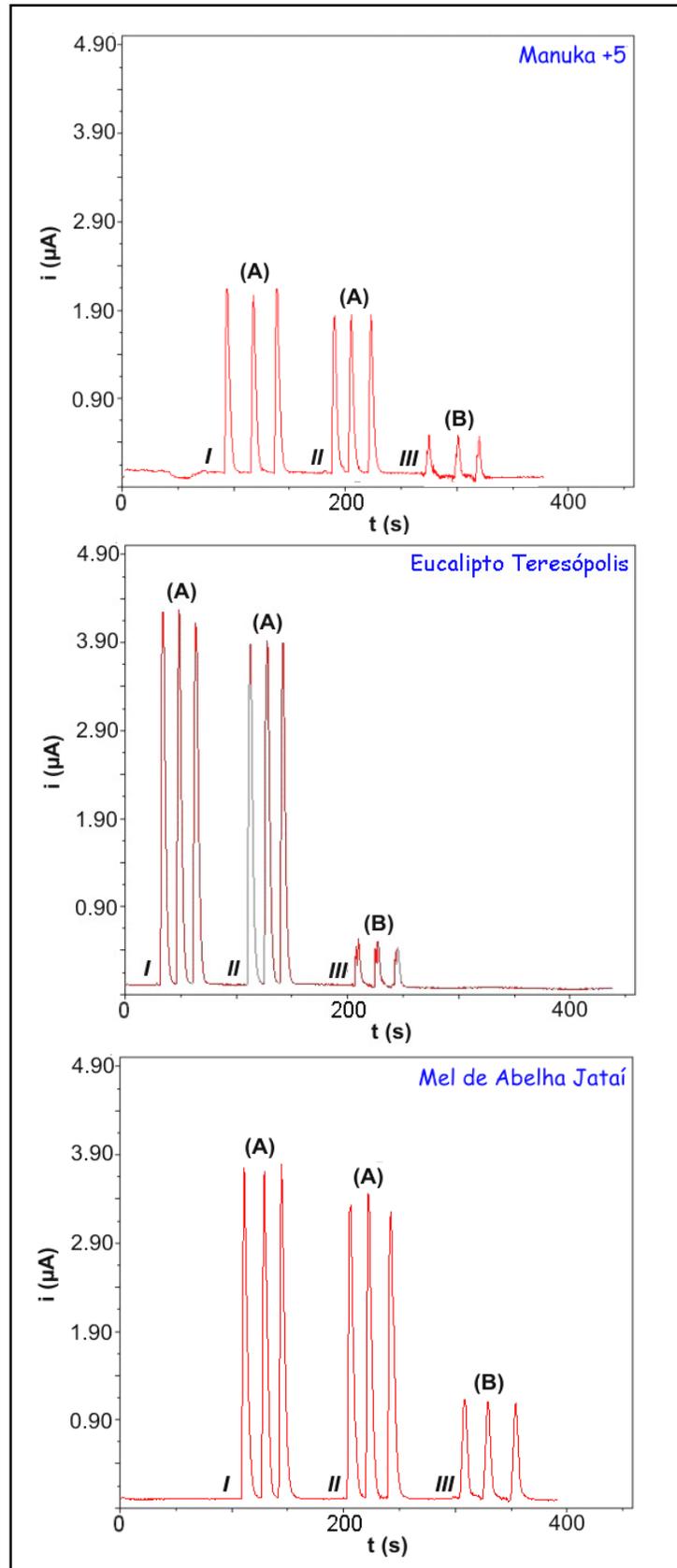


Figura 64: Determinação amperométrica diferencial do H_2O_2 nas amostras de mel.

Para os testes de recuperação, o mesmo procedimento foi adotado. Aos dois balões contendo a amostra de mel, um padrão de H_2O_2 foi adicionado com a concentração final de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. O cálculo do teor de recuperação foi o mesmo ilustrado na determinação espectrofotométrica do H_2O_2 . A tabela 10 mostra as concentrações de H_2O_2 ($\mu\text{g g}^{-1}$), o intervalo de confiança (μ) para $\alpha = 0,05\%$ ou 95% de confiabilidade, o coeficiente de variância (CV) e o resultado dos testes de recuperação para as medidas amperométricas das 17 amostras de mel.

Tabela 10: Concentrações de H_2O_2 ($\mu\text{g g}^{-1}$), intervalos de confiança ($\alpha = 0,05\%$), coeficientes de variância (CV) e o resultado dos testes de recuperação para as medidas amperométricas das 17 amostras de mel.

Amostra	Origem Botânica / Geográfica	H_2O_2 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	CV (%)	Recuperação (%)
1	Manuka +5 / Nova Zelândia	$98,20 \pm 2,00$	1,44	98
2	Laranjeira / Japão	$40,50 \pm 2,05$	3,33	100
3	Rengue / Japão	$93,91 \pm 0,22$	4,12	88
4	Cassutinga / F.Santana (BA)	$47,61 \pm 0,45$	2,76	97
5	Velame / Sta Bárbara (MG)	$20,33 \pm 0,28$	4,00	87
6	Morrão de Candeia / Teresópolis (RJ)	$131,00 \pm 1,45$	4,61	88
7	Bracatinga / Teresópolis (RJ)	$8,12 \pm 0,59$	1,57	95
8	Cipó-Uva / Teresópolis (RJ)	$8,57 \pm 0,24$	4,55	93
9	Laranjeira / Teresópolis (RJ)	$4,32 \pm 0,33$	3,70	92
10	Laranjeira / Juiz de Fora (MG)	$28,09 \pm 1,48$	0,20	88
11	Assa Peixe / Teresópolis (RJ)	$71,18 \pm 6,10$	1,22	91
12	Assa Peixe / Juiz de Fora (MG)	$46,75 \pm 0,85$	2,52	99
13	Silvestre / Teresópolis (RJ)	$142,01 \pm 4,44$	2,28	95
14	Silvestre / Viçosa (MG)	$155,04 \pm 2,45$	1,91	90
15	Eucalipto / Teresópolis (RJ)	$214,32 \pm 4,23$	2,17	91
16	Eucalipto / Juiz de Fora (MG)	$91,46 \pm 3,57$	3,61	101
17	Mel Abelha Jataí / Campinas (SP)	$160,00 \pm 3,65$	4,89	103
Média	-	80,08	2,90	94
V max	-	214,32	4,89	103
V min	-	4,32	0,20	87

5.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia amperométrica para determinação de H_2O_2 associada ao sistema por injeção em fluxo e o uso de reatores tubulares enzimáticos imobilizados demonstrou ser uma técnica confiável para a quantificação dos teores deste analito nas amostras de mel. A importância da adaptação da imobilização enzimática no sistema FIA e a metodologia descrita reforça o potencial do estudo frente a matrizes complexas como o mel. Protocolos de imobilização, reutilização e estocagem dos reatores tubulares foram facilmente adaptados da determinação espectrofotométrica, sem variações significativas em termos de atividade catalítica enzimática.

Na otimização dos parâmetros FIA foi demonstrado que volume de injeção de 200 μL , vazão de 1,5 mL min^{-1} e percurso analítico de 53 cm originaram sinais transientes pouco dispersos, bem resolvidos, sem alterar a magnitude dos resultados, com menor consumo de reagentes, economia de material e tempo. Nos estudos, concentrações de H_2O_2 até 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o valor estipulado de vazão, obtiveram 100% de consumo para a peroxidase imobilizada. Em valores superiores de vazão e concentração, a atividade catalítica da enzima teve perda percentual significativa. Estabeleceu-se então, que para a quantificação de peróxido de hidrogênio nas amostras de mel, seria utilizada uma concentração padrão de 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 para as análises amperométricas diferenciais.

Os testes de repetibilidade para amostras + padrão de H_2O_2 e para as amostras diluídas em solução tampão passando ou não pelo reator enzimático apresentaram estabilidade e precisão nas análises. Os resultados foram semelhantes em três diferentes faixas de concentrações de mel, com coeficientes de variância obtidos inferiores a 6%. Comprovou-se também que os mini-compressores de ar adaptados ao sistema em fluxo e detectores amperométricos constituíram uma alternativa versátil para a determinação em tempo real (*on line*) do analito em questão, com pequenos gastos de volume da amostra injetada.

Com a otimização dos principais parâmetros da metodologia obteve-se uma curva analítica bastante precisa com elevado grau de concordância entre os resultados

alcançados nas análises para as injeções das soluções padrão de H_2O_2 . A ampla faixa de linearidade da reta ($0,5$ a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e coeficiente de regressão linear igual a $0,99892$ mostram a correlação entre corrente de oxidação e concentração de H_2O_2 . Valores baixos de limite de detecção ($0,29 \mu\text{mol L}^{-1}$) e quantificação ($0,38 \mu\text{mol L}^{-1}$) demonstraram a sensibilidade da metodologia amperométrica nesse tipo de determinação. Durante a quantificação de H_2O_2 nas amostras de mel os resultados variaram entre $4,32 \mu\text{g g}^{-1}$ (Laranjeira Teresópolis) e $214,32 \mu\text{g g}^{-1}$ (Eucalipto Teresópolis), com valores médios de peróxido de hidrogênio para as 17 amostras analisadas de $80,08 \mu\text{g g}^{-1}$. Os experimentos apresentaram coeficientes de variância e recuperação médios de $2,81\%$ e 94% , respectivamente. A amperometria diferencial provou ser uma técnica com alta sensibilidade, precisão, robustez e elevada frequência analítica (cerca de 90 determinações h^{-1}) na determinação dos teores de H_2O_2 em amostras comerciais de mel.

5.5. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS E AMPEROMÉTRICOS

As concentrações de H_2O_2 na determinação espectrofotométrica apresentaram-se equivalentes às encontradas pela amperometria diferencial. Mesmo com a determinação em paralelo, variações nos teores puderam ser observadas, muito provavelmente a fatores como tempo de estocagem, manipulação das amostras, variação de temperatura e diluição das matrizes. A tabela 11 e a figura 65 fazem um comparativo entre a técnica espectrofotométrica e amperométrica para os valores medidos de H_2O_2 para as 17 amostras de mel analisadas. A avaliação qualitativa do coeficiente de correlação linear de Pearson (ou coeficiente de regressão linear) entre as determinações podem ser avaliadas quanto ao seu grau de significância conforme a tabela 12 [162].

O teste F é usado para comparar as precisões de dois grupos de dados e verificar se são “significativamente” diferentes entre si, onde F é igual ao quociente

entre os quadrados do desvio padrão (ou variância) e s_1^2 e s_2^2 os desvios-padrão do maior e do menor valor, respectivamente [166]:

$$F_{\text{calculado}} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Para a análise espectrofotométrica e amperométrica do H_2O_2 encontramos um $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ (19,0), para um nível de confiança de 95% ($\alpha=0,05$) em 14 das 17 amostras testadas, o que leva a concluir que a maioria dos desvios-padrão NÃO são significativamente diferentes um dos outros. Em 3 amostras apenas (Cassutinga, Morrão de Candeia e Assa-Peixe Juiz de Fora) verificou-se um $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, caracterizando, de forma significativa, uma diferença entre os desvios-padrão quando comparamos a precisão das 2 técnicas (tabela 11).

O teste t é usado para comparar um grupo de medidas com outro, a fim de decidir-se se eles são ou não diferentes, ou seja, testa-se a hipótese nula, a qual estabelece que os valores médios de dois conjuntos de medidas são iguais [166]. Ao comparar as diferenças individuais entre os resultados das 17 amostras de mel por espectrofotometria e amperometria pelo teste t foi usado a seguinte relação matemática [166]:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\bar{d}}{s_d} \sqrt{n} \quad , \text{ onde} \quad s_d = \sqrt{\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{n-1}}$$

A grandeza \bar{d} é a média das diferenças entre os métodos espectrofotométrico e amperométrico, d_i é a diferença individual para cada exemplar de mel do teor de H_2O_2 entre os dois métodos, n é o número de pares dos dados (17 amostras) e s_d é a raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre a d_i e \bar{d} .

Na comparação entre a determinação espectrofotométrica e amperométrica do teor de H_2O_2 nas 17 amostras de mel foi encontrado um $t_{\text{calculado}} = 1,632$, menor que o $t_{\text{tabelado}} = 2,120$ para um nível de confiança de 95% ($\alpha=0,05$), onde conclui-se que NÃO houve diferença significativa entre os resultados dos 2 métodos e não foi verificado a existência de erros sistemáticos durante a realização dos procedimentos. Segundo o teste t, existe menos de 5% de chance que os resultados obtidos com as duas metodologias sejam diferentes.

Tabela 11: Comparação entre origem geográfica e botânica e as determinações espectrofotométrica e amperométrica de H_2O_2 nas 17 amostras comerciais de mel, além dos valores calculados para o teste F e t para um nível de confiança de 95% ($\alpha=0,05$) entre os dois métodos.

Amostra	Origem Botânica / Geográfica	H_2O_2 ($\mu g g^{-1}$)		Teste F F tabelado = 19,0 ^a
		Espectrofotometria	Amperometria	
1	Manuka +5 / Nova Zelândia	123,50 ± 2,30	98,20 ± 2,00	3,3
2	Laranjeira / Japão	32,60 ± 1,95	40,50 ± 2,05	6,5
3	Rengue / Japão	94,08 ± 1,88	93,91 ± 0,22	11,4
4	Cassutinga / F.Santana (BA)	47,68 ± 1,53	47,61 ± 0,45	36,7
5	Velame / Sta Bárbara (MG)	20,46 ± 1,97	20,33 ± 0,28	5,4
6	Morrão de Candeia / Teresópolis (RJ)	123,89 ± 6,01	131,00 ± 1,45	52,1
7	Bracatinga / Teresópolis (RJ)	64,98 ± 3,36	8,12 ± 0,59	8,2
8	Cipó-Uva / Teresópolis (RJ)	51,80 ± 1,29	8,57 ± 0,24	14,9
9	Laranjeira / Teresópolis (RJ)	4,22 ± 0,26	4,32 ± 0,33	13,9
10	Laranjeira / Juiz de Fora (MG)	39,78 ± 1,58	28,09 ± 1,48	14,5
11	Assa Peixe / Teresópolis (RJ)	70,66 ± 6,01	71,18 ± 6,10	15,9
12	Assa Peixe / Juiz de Fora (MG)	90,52 ± 3,50	46,75 ± 0,85	42,2
13	Silvestre / Teresópolis (RJ)	120,44 ± 4,79	142,01 ± 4,44	12,3
14	Silvestre / Viçosa (MG)	150,88 ± 3,45	155,04 ± 2,45	5,4
15	Eucalipto / Teresópolis (RJ)	206,15 ± 4,02	214,32 ± 4,23	6,3
16	Eucalipto / Juiz de Fora (MG)	85,54 ± 3,10	91,46 ± 3,57	7,4
17	Mel Abelha Jataí / Campinas (SP)	199,67 ± 6,65	160,00 ± 3,65	5,6
Média	-	89,86	80,08	Teste t
V max	-	206,15	214,32	t tabelado = 2,120 ^a
V min	-	4,22	4,32	t calculado = 1,632

a = Valores de F e t tabelados para um nível de confiança de 95% ($\alpha=0.05$). Fonte: Harris (2005) [166]

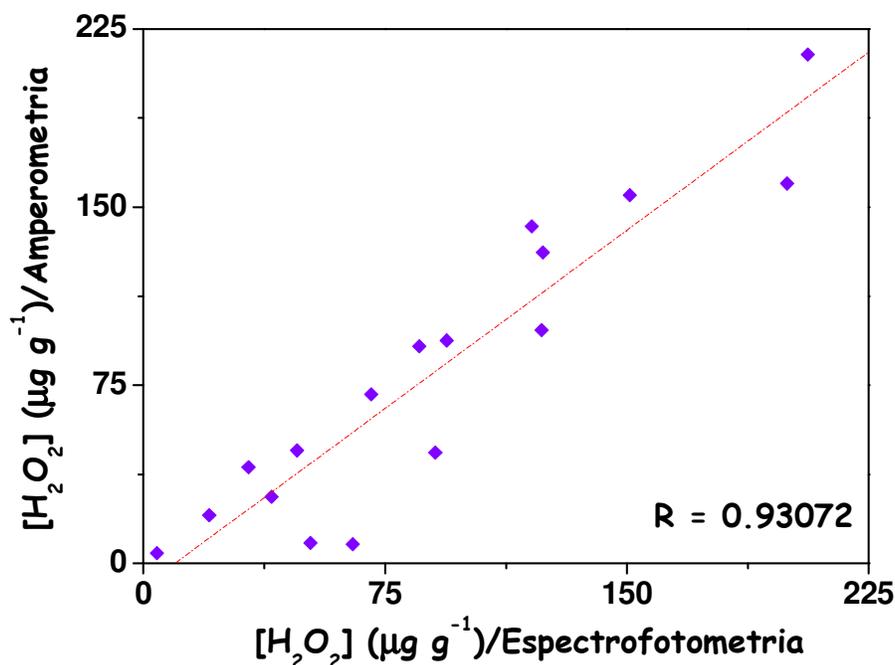


Figura 65: Comparação dos resultados obtidos entre a técnica espectrofotométrica e a amperométrica diferencial para a determinação do H_2O_2 em amostras de mel.

Tabela 12: Avaliação qualitativa do grau de correlação de Pearson entre duas variáveis.

<i>IRI</i>	A correlação é dita
0	NULA
0 --- 0,3	FRACA
0,3 -- 0,6	REGULAR
0,6 -- 0,9	FORTE
0,9 -- 1	MUITO FORTE
1	PLENA ou PERFEITA

Fonte: Callegari-Jacques (2003) [162].

De acordo com o coeficiente de correlação linear obtido conclui-se, portanto, que existe uma correlação de grau MUITO FORTE ($R= 0,93$) entre os níveis de H_2O_2 quantificados pela metodologia espectrofotométrica e amperométrica diferencial. A tabela 13 resume outro comparativo entre as técnicas e os resultados obtidos por Manzoori, Amjadi e Orooji (2006) [154] que determinaram o H_2O_2 em amostras de méis iranianas por espectrofluorimetria e obtenção da enzima peroxidase a partir de extratos crus de Kohlrabi (*Brassica oleracea gongylodes*) [154]. Cabe lembrar que as diferenças entre as pesquisas podem estar relacionadas ao número de amostras analisadas (17 contra 4) e a variabilidade da origem geográfica e botânica dos exemplares.

Tabela 13: Comparação entre parâmetros e metodologias para a determinação de H_2O_2 em amostras de mel.

Parâmetro	METODOLOGIA		
	Espectrofotometria	Amperometria	Espectrofluorimetria^a
H_2O_2 ($\mu g g^{-1}$)			
<i>Média</i>	89,86	80,08	8,70
<i>V max</i>	206,15	214,32	10,50
<i>V min</i>	4,22	4,32	6,90
<i>LD</i> ($\mu mol L^{-1}$)	0,70	0,29	0,13
<i>LQ</i> ($\mu mol L^{-1}$)	0,88	0,38	0,42
<i>CV</i> (%)			
<i>Média</i>	3,70	2,81	1,48
<i>V Max</i>	7,60	4,89	ni
<i>V Min</i>	1,90	0,20	ni

(a) Fonte: Manzoori, Amjadi e Orooji (2006) [154]

ni: não informado

Tabela 13: continuação.

Parâmetro	METODOLOGIA		
	Espectrofotometria	Amperometria	Espectrofluorimetria ^a
Recuperação (%)			
Média	96	94	100
V Max	109	103	104
V Min	82	87	98
Frequência Analítica (determinações h ⁻¹)	20	90	ni
Coefficiente de Correlação [R]	0,99971	0,99892	0,99900
Faixa de Linearidade (μmol L⁻¹)	1-100	0,5-100	0,29-5,59

(a) Fonte: Manzoori, Amjadi e Orooji (2006) [154]

ni: não informado

A figura 66 mostra a distribuição dos teores de H₂O₂ das 17 amostras analisadas em torno da média para as duas técnicas utilizadas.

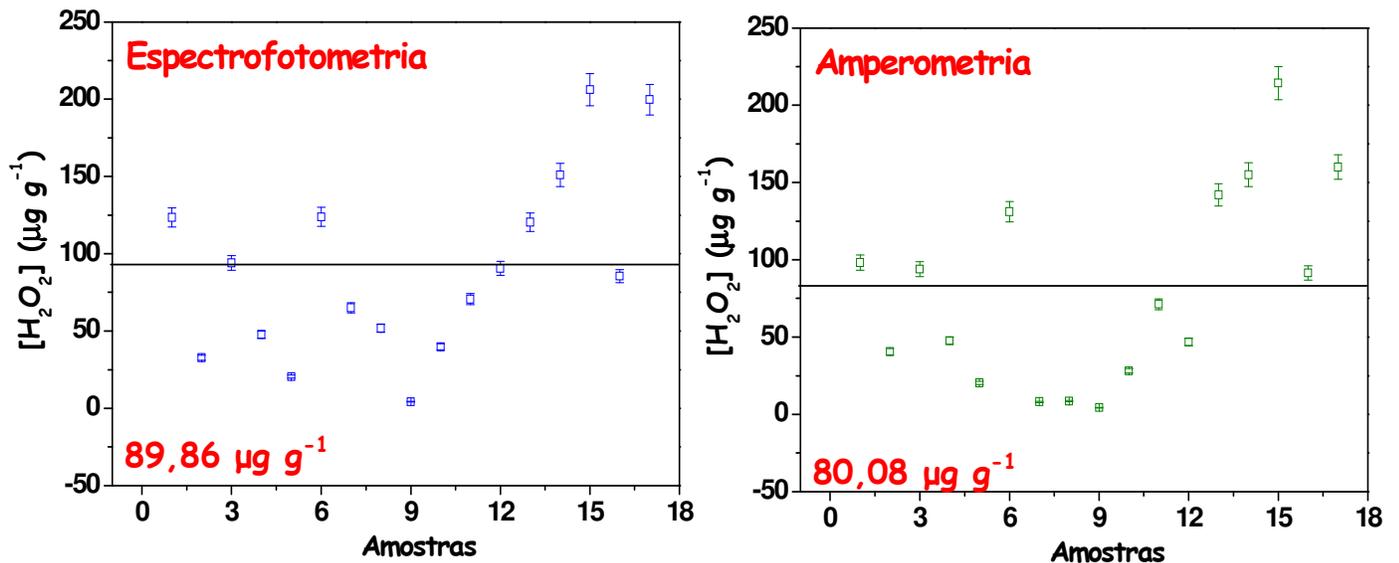


Figura 66: Distribuição dos teores de H₂O₂ (μg g⁻¹) em torno do valor médio para as duas técnicas utilizadas na pesquisa.

As pesquisas também tiveram como objetivo tentar relacionar os teores de H_2O_2 com a origem geográfica as amostras, entretanto os resultados não foram conclusivos, com algumas discrepâncias, para os exemplares analisados. Ao agrupar, de forma aleatória, as amostras em 4 classes conforme a origem geográfica: Teresópolis (RJ), Minas Gerais, estrangeiras e “outras” verificaram-se, em média, teores de H_2O_2 muito próximos com valores maiores para as amostras do estado do Rio de Janeiro. Para a classificação botânica junto aos teores de H_2O_2 , ficou evidente que as amostras, Silvestre, Assa-Peixe e Laranjeira obtiveram valores similares de peróxido de hidrogênio. Os méis de Eucalipto Teresópolis e Juiz de Fora foram os exemplares com maior diferença nas concentrações de H_2O_2 . As demais amostras por estarem representadas com apenas um exemplar, em termos de origem botânica, não puderam ser classificadas neste parâmetro.

**6. DETERMINAÇÃO
AMPEROMÉTRICA DE
CATALASE EM AMOSTRAS DE
MEL**

6.1. INTRODUÇÃO

Outro fator relacionado à atividade antimicrobiana, porém pouco elucidado pelas investigações com o mel, são os níveis da enzima catalase nas amostras. Originada no alimento através dos pólenes das flores, sua influência nesta propriedade terapêutica é indireta visto que ela catalisa a oxidação do H_2O_2 em oxigênio e água (figura 5). Uma alta atividade de catalase no mel, sem dúvida, representaria diminuição dos teores de H_2O_2 e um comprometimento da atividade antibacteriana total das amostras [53].

Por conseguinte, tais motivos estimularam o desenvolvimento de uma metodologia analítica que possa quantificar os teores de catalase nas amostras de mel e verificar se os mesmos, realmente, exibem uma correlação inversa com os níveis de H_2O_2 anteriormente quantificados.

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1. Reagentes e Soluções

Os mesmos reagentes e soluções, obtidos a partir de grau analítico, foram utilizados conforme item 5.2.1.. Exclui-se nesta determinação a peroxidase, a qual foi substituída pela enzima catalase 2950 UI mg^{-1} (ou hidroperoxidase) E.C. 1.11.1.6 adquirida da Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, USA) e estocada em *freezer* à $-20\text{ }^{\circ}C$ (frasco comercial e em reatores tubulares). Padrões de catalase entre 100 e 5000 UI mL^{-1} foram preparados em balões volumétricos de 25,00 mL pesando-se diretamente a enzima e diluindo em solução tampão fosfato pH 7,4 (*vide* item 4.2.1) para os testes de imobilização enzimática. Solução eletrolítica de KCl e K_2PtCl_6 (pH 4,8), nas mesmas concentrações da quantificação amperométrica do H_2O_2 , foram usadas no

armazenamento do eletrodo de referência de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ e para a eletrodeposição da platina na superfície do eletrodo de ouro, respectivamente.

6.2.2. Instrumentação

Na determinação amperométrica da catalase, para os registros das correntes de oxidação de H_2O_2 e demais testes eletroanalíticos, a instrumentação usada foi à mesma descrita no item 5.2.2. (figuras 45 a 48). A única diferença, em relação aos itens correspondentes dos capítulos 4 e 5, foi a utilização de uma bomba peristáltica marca Minipuls 3 Gilson[®] responsável pela propulsão e deslocamento das soluções no sistema FIA, em substituição aos mini-compressores tipo “bomba de aquário”. Seu funcionamento fundamenta-se num suporte ou banda que comprime por força de uma mola o tubo contra dois ou mais cilindros a todo instante, forçando então um fluxo contínuo de fluido e com vazão controlada por um motor, através de toda a tubulação (figura 67).

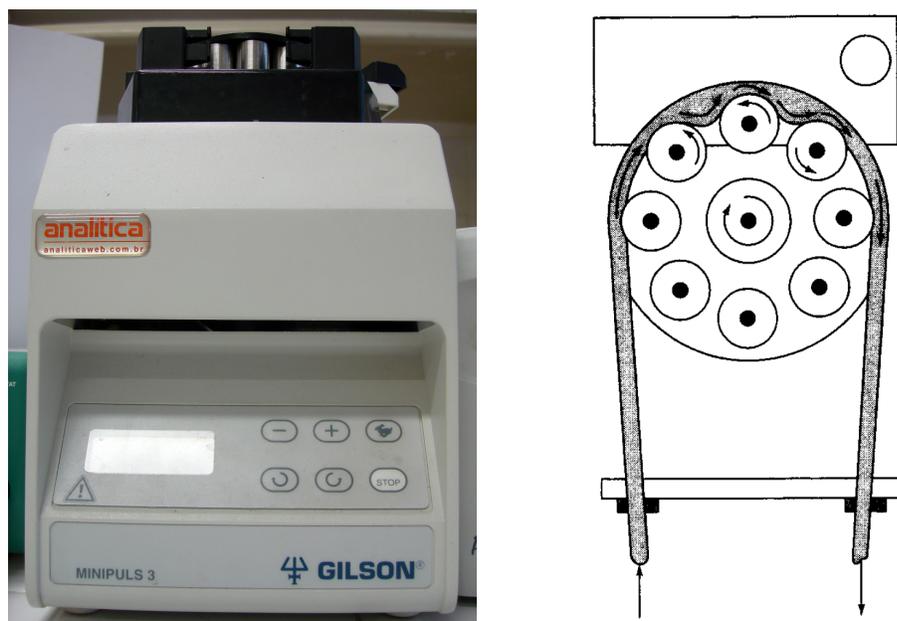


Figura 67: Bomba peristáltica utilizada para propelir as soluções e reagentes durante a análise em fluxo para a determinação da catalase. Em destaque, ao lado direito, o diagrama mostrando o rotor e o canal de uma bomba peristáltica (Fonte: adaptado de Skoog, Holler e Nieman (2002) [164]).

Para o tratamento estatístico dos dados foram utilizados os programas Microcal Origin 7.0 e Microsoft Office Excel 2003.

6.2.3. Imobilização Enzimática e Construção dos Reatores Tubulares

A metodologia de imobilização da catalase na resina Amberlite foi semelhante ao descrito no item 4.2.3. e envolveu a construção de reatores tubulares contendo diferentes padrões da enzima imobilizada, com o auxílio de um agente ativador (glutaraldeído), sobre uma resina de troca iônica (suporte). O preparo dos reatores, visando sua utilização *on-line*, durou cerca de 30 minutos, contrastando com alguns trabalhos que requerem horas ou até mesmo dias para realizar a imobilização enzimática em suportes ou eletrodos [140, 143].

A figura 68 demonstra um diagrama esquemático da imobilização da catalase. Em comparação ao descrito no capítulo 4, a principal diferença consistiu na etapa final do procedimento. Em particular, nesta metodologia, o reator tubular foi montado e acoplado ao sistema FIA antes da imobilização definitiva da catalase juntamente a resina Amberlite IRA-743 e o agente ativador (GLU). Com uma vazão controlada pela bomba peristáltica, em $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, 25,00 mL de uma solução diluída de padrão de catalase, em balão volumétrico com tampão fosfato pH 7,4, passou pelo reator em cerca de 17 minutos de funcionamento do sistema. Em seguida, com auxílio do mesmo sistema em fluxo, lavou-se o reator enzimático com solução tampão fosfato para eliminar o excesso de reagente. Enfim, o procedimento levou a formação, de um reator tubular composto pela resina Amberlite IRA-743, glutaraldeído e catalase (IRA – GLU – CAT), unidos por ligações covalentes. A figura 69 ilustra os reatores tubulares com diferentes padrões de catalase imobilizados usados na pesquisa.

Em comparação à imobilização da peroxidase na resina Amberlite IRA-743, não foi possível realizar o mesmo procedimento, visto que a característica física da enzima catalase dificultou sua diluição em pequenos volumes (μL) de reagentes. Os reatores

preparados apresentaram alta estabilidade e quando não estiveram sendo usados foram armazenados em *freezer* sob uma temperatura de -20°C .

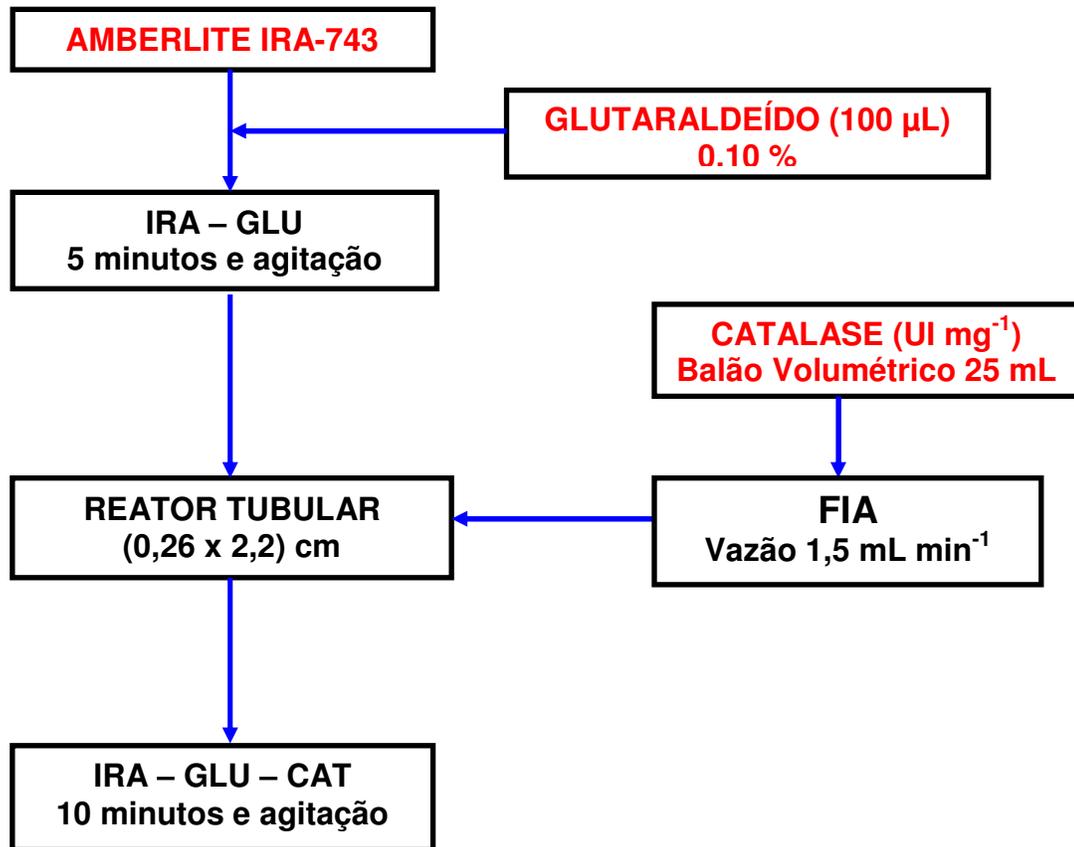


Figura 68: Diagrama esquemático para a imobilização da catalase sobre a resina de troca iônica. IRA: Amberlite IRA-743, GLU: glutaraldeído e CAT: catalase.

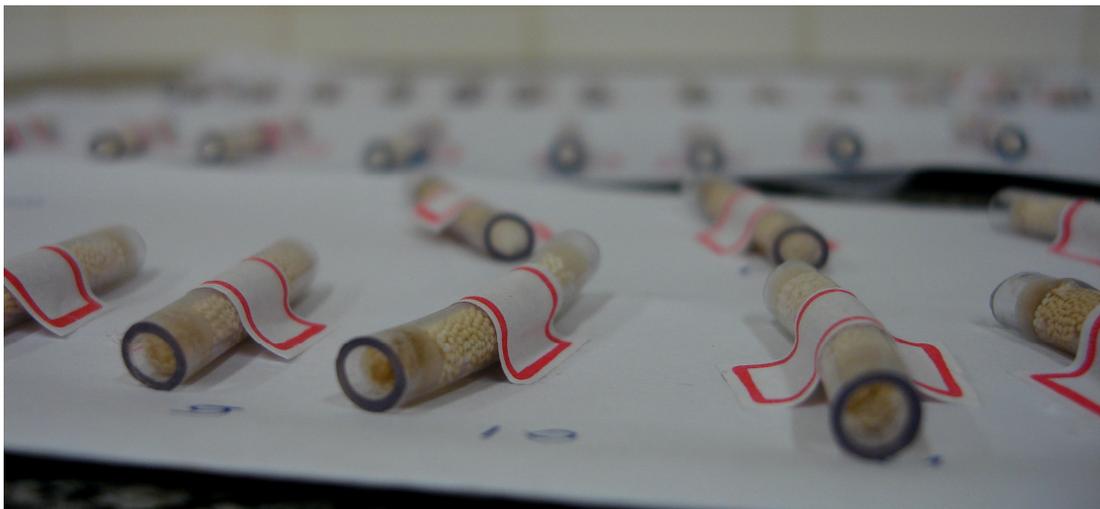


Figura 69: Reatores tubulares com a enzima catalase imobilizada.

As reações químicas envolvidas na formação das ligações covalentes entre a Amberlite IRA-743 (suporte), o glutaraldeído (ativador) e a catalase (enzima) está ilustrada na figura 70.

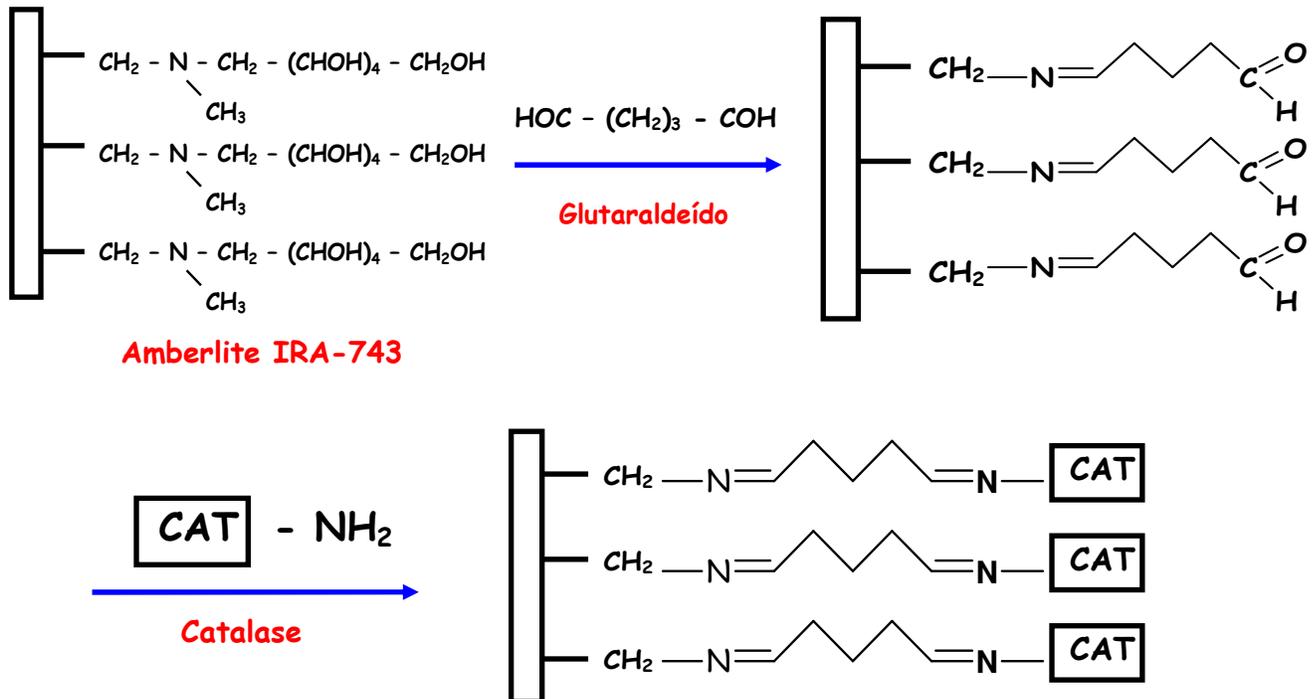


Figura 70: Processo químico de formação das ligações covalentes durante a imobilização Amberlite IRA-743 – GLU – CAT.

6.2.4. Sistema de Injeção em Fluxo Associado aos Reatores Tubulares com Detecção Amperométrica

O sistema de injeção em fluxo para a determinação amperométrica da catalase foi semelhante ao utilizado no capítulo anterior. A instrumentação em modo de análise em linha única, basicamente era constituída, pelo injetor comutador (figura 19), reator tubular e sistema de detecção (célula eletroanalítica contendo eletrodos de trabalho, referência e auxiliar conectados a um potenciostato). Por utilizar uma bomba peristáltica ligada diretamente ao reservatório de eletrólito, eliminou-se a válvula de controle de

fluxo que pressionava o tubo de Tygon[®] no sistema em fluxo. A representação esquemática para a determinação da corrente de oxidação do H_2O_2 e seu decréscimo seja para os padrões de catalase ou a enzima originada das amostras de mel em diferentes reatores tubulares está representada nas figura 71. Destaca-se que os diagramas foram obtidos de maneira *on-line*.

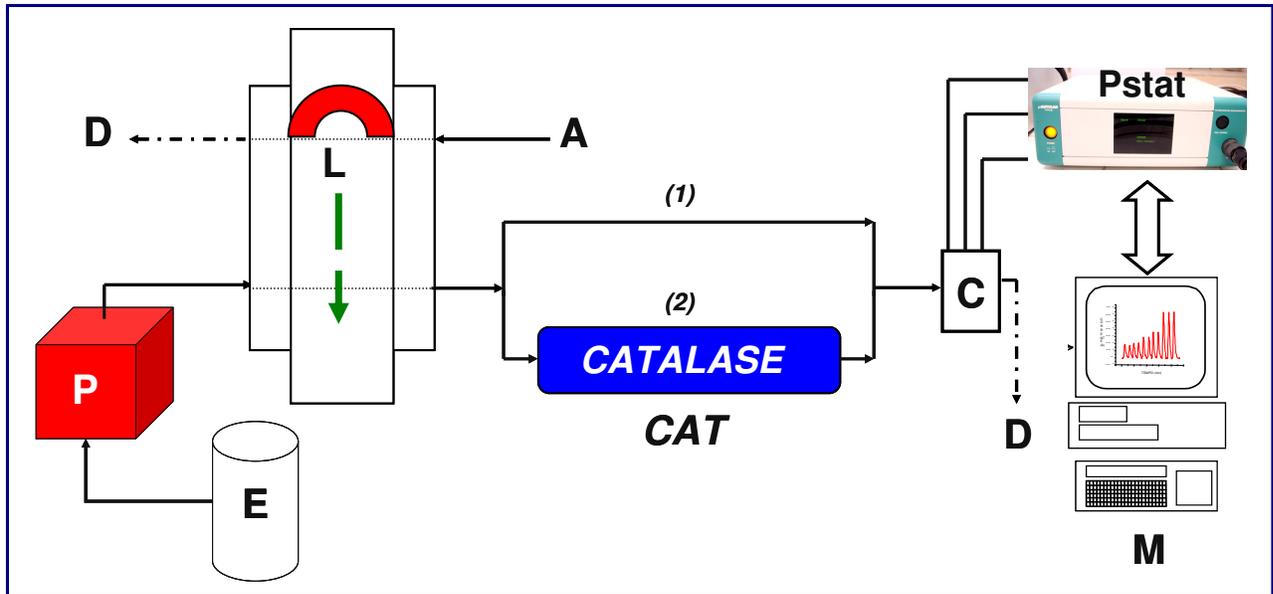


Figura 71: Diagrama esquemático do sistema FIA empregado para o registro da corrente de oxidação do peróxido de hidrogênio. A: amostra, P: bomba peristáltica, E: eletrólito (solução tampão fosfato pH 7,4), L: *loop* ou alça de amostragem, CAT: enzima catalase imobilizada em reator tubular, C: célula eletroanalítica, Pstat: potenciostato/galvanostato, M: microcomputador e D: descarte. Na primeira etapa (1) da determinação amperométrica, padrão de H_2O_2 é injetado sem passar pelo reator tubular. Já na segunda etapa (2) o mesmo padrão passa pela catalase imobilizada. O decréscimo do sinal de oxidação do H_2O_2 é diretamente proporcional à quantidade de catalase imobilizada no reator tubular.

6.2.5. Metodologia Analítica

A metodologia para a quantificação da catalase nas amostras de mel é uma adaptação da técnica desenvolvida na determinação amperométrica diferencial do H_2O_2 (capítulo 5), com a manutenção de todos os princípios inerentes à técnica, construção e preparo de sensores eletroquímicos e eletrodos modificados.

A determinação amperométrica da catalase baseou-se na capacidade da enzima imobilizada em reator tubular, associada ao sistema de análise em fluxo, em oxidar uma concentração padrão fixa de H_2O_2 . Neste caso a medida diferencial exigiu duas determinações:

I_A : Injeção do padrão de H_2O_2 no sistema em fluxo sem a enzima catalase imobilizada;

I_B : Injeção do padrão de H_2O_2 no sistema em fluxo com a enzima catalase presente no mel imobilizada na resina Amberlite IRA-743.

No primeiro caso o sinal registrado corresponde ao padrão de H_2O_2 estipulado e no segundo o registro corresponde ao padrão de H_2O_2 que não foi consumido pela catalase imobilizada. A diferença entre os 2 sinais de corrente relaciona-se com a corrente limite equivalente à concentração de H_2O_2 padrão que foi consumida por uma quantidade de catalase padrão imobilizada na resina Amberlite IRA 743 – GLU. Os cálculos matemáticos para a determinação da catalase estão descritos conforme dedução na figura 72. Em seguida, a partir da construção de uma curva de calibração entre a corrente de oxidação (H_2O_2 consumido) e padrões de catalase ($UI\ mL^{-1}$) imobilizados nos reatores tubulares, os teores da enzima puderam ser mensurados nas amostras de mel.

$$i_A = k \cdot \text{CH}_2\text{O}_2 \text{ padrão}$$

cálculo do valor de k

$$i_B = k \cdot \text{CH}_2\text{O}_2 \text{ padrão não consumido pela catalase}$$

$$i_A - i_B = (k \cdot \text{CH}_2\text{O}_2 \text{ padrão}) - (k \cdot \text{CH}_2\text{O}_2 \text{ padrão não consumido pela catalase})$$

colocando k em evidência, temos:

$$i_A - i_B = k \cdot (\text{CH}_2\text{O}_2 \text{ padrão} - \text{CH}_2\text{O}_2 \text{ padrão não consumido pela catalase})$$

cálculo da concentração de peróxido de hidrogênio consumido por um padrão de catalase (UI mg⁻¹)

construindo uma curva de calibração com vários padrões de catalase (UI mg⁻¹), imobilizados na resina Amberlite IRA-743 – GLU, prevemos a relação linear entre concentração da enzima é o decréscimo da corrente (referente à concentração padrão H₂O₂ consumido)

Figura 72: Cálculos para a determinação amperométrica diferencial da catalase nas amostras de mel em função do consumo do H₂O₂ pela enzima imobilizada.

As células eletroquímicas para a eletrodeposição da Pt no eletrodo de Au e determinação amperométrica do H_2O_2 estão ilustrados nas figuras 47 e 48, respectivamente. Para os registros dos sinais de oxidação os mesmos parâmetros eletroanalíticos foram seguidos conforme estipulado no capítulo 5.

Para a otimização da metodologia durante a quantificação da catalase nas amostras de mel estudos adicionais, especialmente, aqueles inerentes à estabilidade da atividade catalítica enzimática foram realizados. Investigação da capacidade de imobilização da CAT em diferentes resinas; influência da temperatura, tempo de imobilização, estocagem na estabilidade enzimática para o consumo de padrões de H_2O_2 e a criação de protocolos de reutilização e condicionamento da enzima forneceram as condições mais adequadas para as análises. Por fim, curvas analíticas foram construídas, testes de recuperação realizados e o teor de CAT nas amostras de méis quantificado com a devida avaliação estatística dos dados a fim de consolidar a metodologia proposta.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.3.1. Estudo da Imobilização da Catalase em Diferentes Resinas

De forma semelhante ao estudo realizado no item 4.3.2., verificou-se a habilidade da imobilização da catalase em diferentes suportes ou resinas junto com auxílio do glutaraldeído, como agente ativador. Novamente, duas resinas aniônicas, Amberlite IRA-743 e IRA-400, e uma catiônica, Amberlite IRA-120 foram escolhidas com o propósito de estudar o comportamento de imobilização diante da catalase. A eficiência da imobilização foi avaliada pelo poder de consumo de um padrão de H_2O_2 ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) pelo reator enzimático. Preparam-se três balões volumétricos de 25,00 mL, contendo 5,08 mg de catalase para cada vidraria e completou-se o volume final com solução tampão fosfato pH 7,4. Seguindo o procedimento descrito no item 6.2.3.,

imobilizou-se os padrões da enzima com auxílio do sistema em fluxo, cuja concentração final obtida de catalase ficou em torno de 600 UI mL^{-1} , com posterior lavagem do reator com a solução de eletrólito suporte. Todos os parâmetros da análise em fluxo usados nos experimentos anteriores foram mantidos: vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, percurso analítico 53 cm e potencial aplicado $+0,60\text{V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

Observou-se, como na peroxidase, que o suporte Amberlite-IRA 743 obteve os melhores resultados na imobilização enzimática, fato esse comprovado pelo maior consumo do padrão de H_2O_2 injetado no sistema em fluxo. As altas correntes observadas para Amberlite IRA-120 e IRA-400 mostraram uma menor capacidade das mesmas em ligar-se covalentemente com o glutaraldeído e a enzima. As resinas Amberlite IRA-120 e IRA-400 tiveram um aumento de sinal de oxidação de 97% e 145%, respectivamente (figura 73).

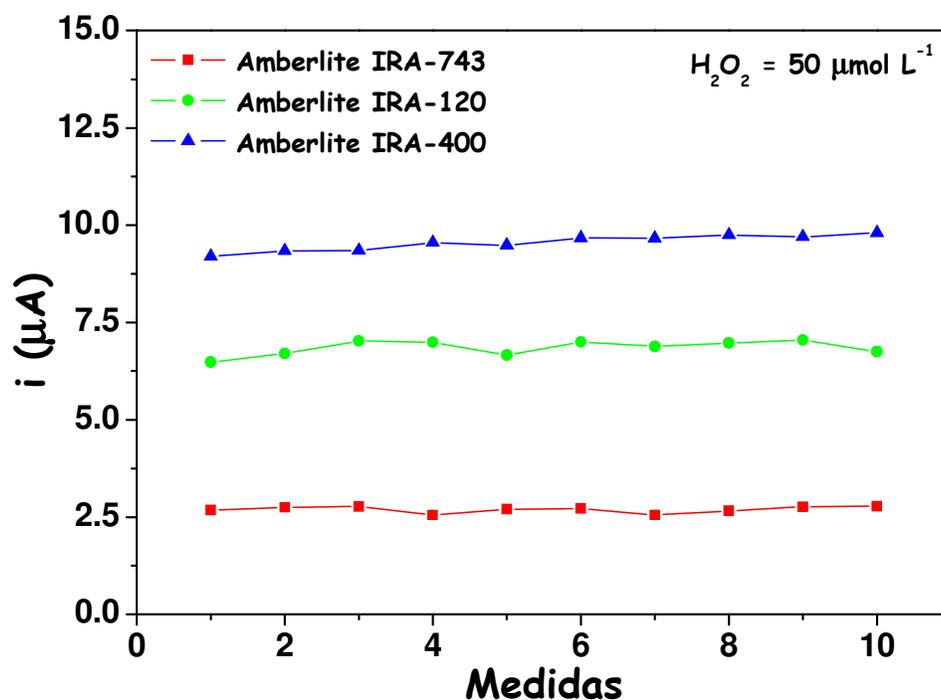


Figura 73: Comparativo da atividade enzimática, para o consumo de um padrão de H_2O_2 , da enzima catalase imobilizada nas resinas Amberlite IRA-120, IRA-400 e IRA-743. Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, caminho percorrido 53 cm , solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

A figura 74 mostra os diagramas obtidos para o consumo de H_2O_2 ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) a partir do padrão de catalase immobilizados nas diferentes resinas estudadas e em comparação a injeção no sistema FIA sem a presença do reator enzimático immobilizado. Observou-se ainda que para concentrações de H_2O_2 menores que $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ nenhuma corrente de oxidação foi verificada para a imobilização da CAT na Amberlite IRA-743.

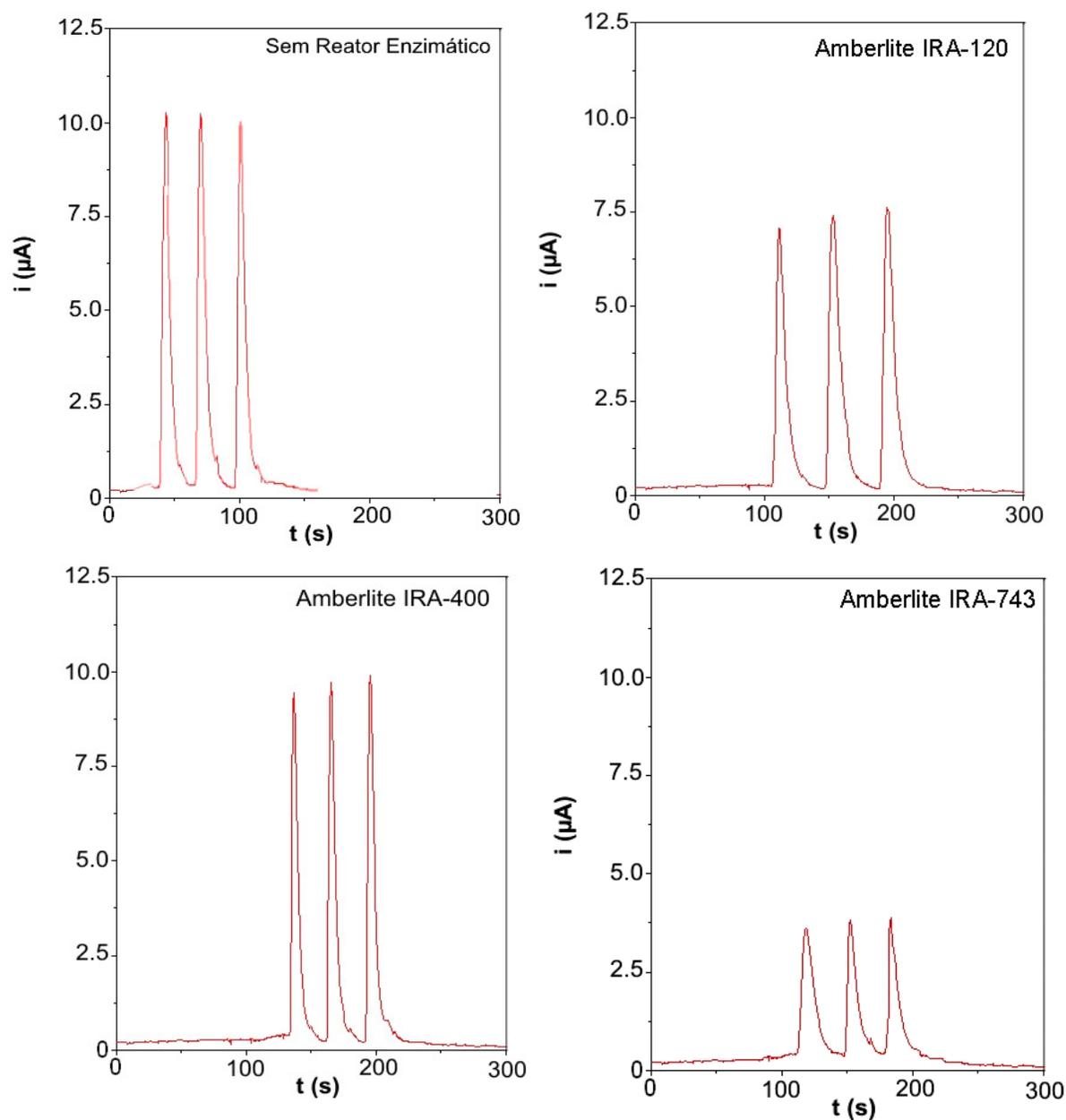


Figura 74: Imobilização da catalase em três resinas diferentes: Amberlite IRA-120; Amberlite IRA-400, Amberlite IRA-743 e sem a presença do reator enzimático. Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, caminho percorrido 53 cm , solução tampão fosfato $\text{pH } 7,4$ e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

6.3.2. Estudo da Estabilidade do Reator Enzimático e Reutilização do Suporte

A manutenção da atividade enzimática é um parâmetro de extrema importância para a metodologia de quantificação da catalase nas amostras de mel. O objetivo do estudo foi avaliar a estabilidade do reator quando submetido a sucessivas injeções de padrões de H_2O_2 . As concentrações escolhidas foram 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com catalase 400 UI mL^{-1} imobilizada na resina. Após 30 injeções, para 2 concentrações de H_2O_2 a atividade catalítica manteve-se praticamente constante, com perda mínima de capacidade de consumo do H_2O_2 (figuras 75 e 76). Os CVs para as 2 determinações na seqüência acima foram de 3%. O estudo comprovou que um único reator enzimático pode ser usado no mínimo em 10 análises em triplicata para a determinação da catalase nas amostras de mel, sem haver comprometimento de sua atividade enzimática. Todos os parâmetros analíticos dos testes anteriores foram mantidos.

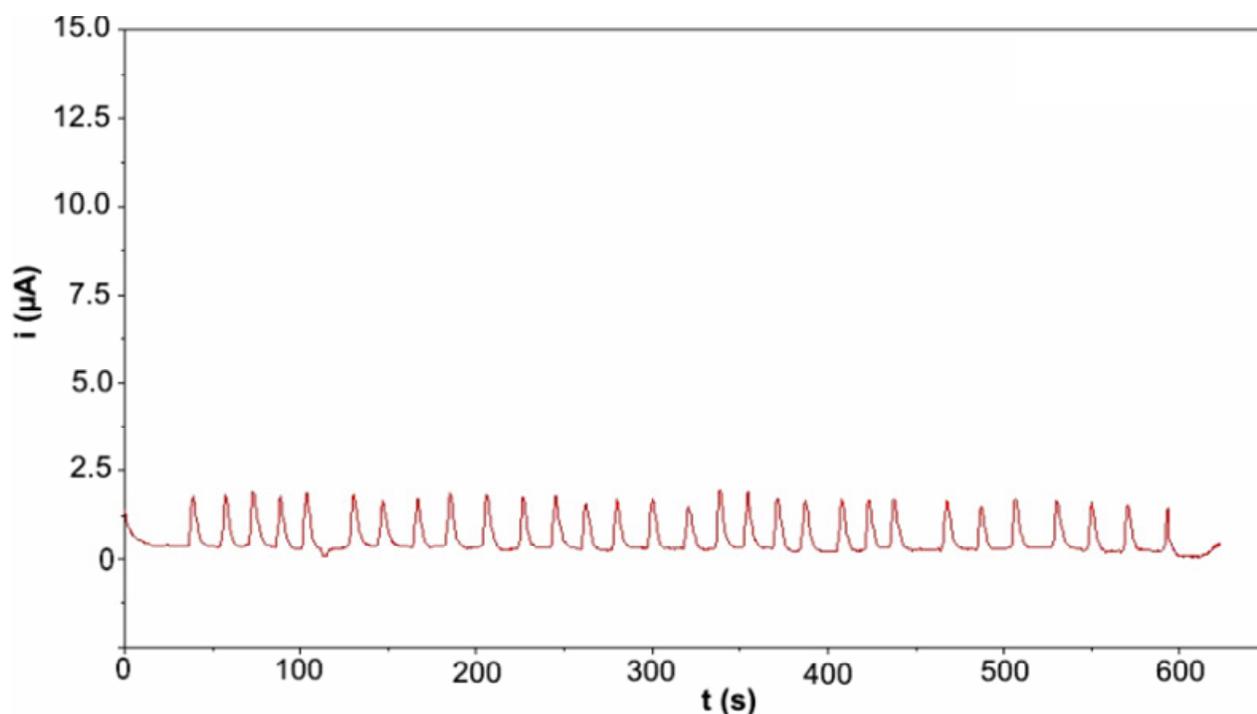


Figura 75: Estudo da estabilidade do reator Imobilizado frente a sucessivas injeções de H_2O_2 . Dados: 30 injeções sistema FIA; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção 200 μL , vazão 1,5 mL min^{-1} , caminho percorrido 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado + 0,60 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

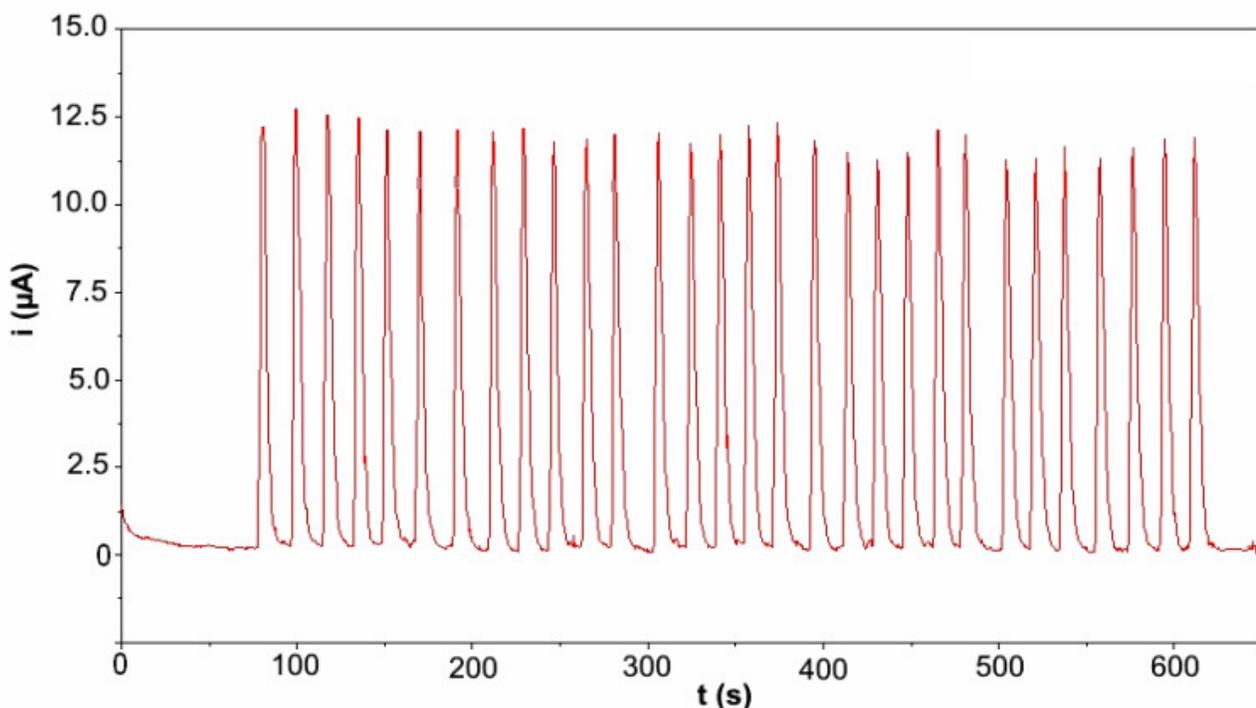


Figura 76: Estudo da estabilidade do reator Imobilizado frente a sucessivas injeções de H_2O_2 . Dados: 30 injeções sistema FIA; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, caminho percorrido 53 cm , solução tampão fosfato pH $7,4$ e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

O estudo da estabilidade da catalase frente à estocagem e nova reutilização também foram avaliados. Em 10 semanas de experimentos, o reator enzimático demonstrou estabilidade em pelo menos 7 semanas para uma concentração de H_2O_2 a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 5 semanas para $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, com posterior perda de atividade até a última semana do estudo, que em termos percentuais ficaram em torno de $14 - 34\%$ e $4 - 59\%$ para a menor e maior concentração de H_2O_2 , respectivamente. Por semana, 30 injeções foram realizadas, e os CVs encontrados para os dois teores de H_2O_2 não ultrapassaram 5% . Os reatores quando não estavam em uso foram estocados em *freezer* a temperaturas $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Considerou-se a 1ª semana de teste, a semana 0, enquanto a última, a semana 11, como ilustrado na figura 77. Conclui-se que a perda da atividade enzimática, não está relacionada ao período de estocagem e sim ao excesso de injeções sucessivas de H_2O_2 . Isto ocasionou uma perda da atividade

enzimática para as subseqüentes análises, por isso, um aumento nos valores de corrente da oxidação do H_2O_2 foram observados.

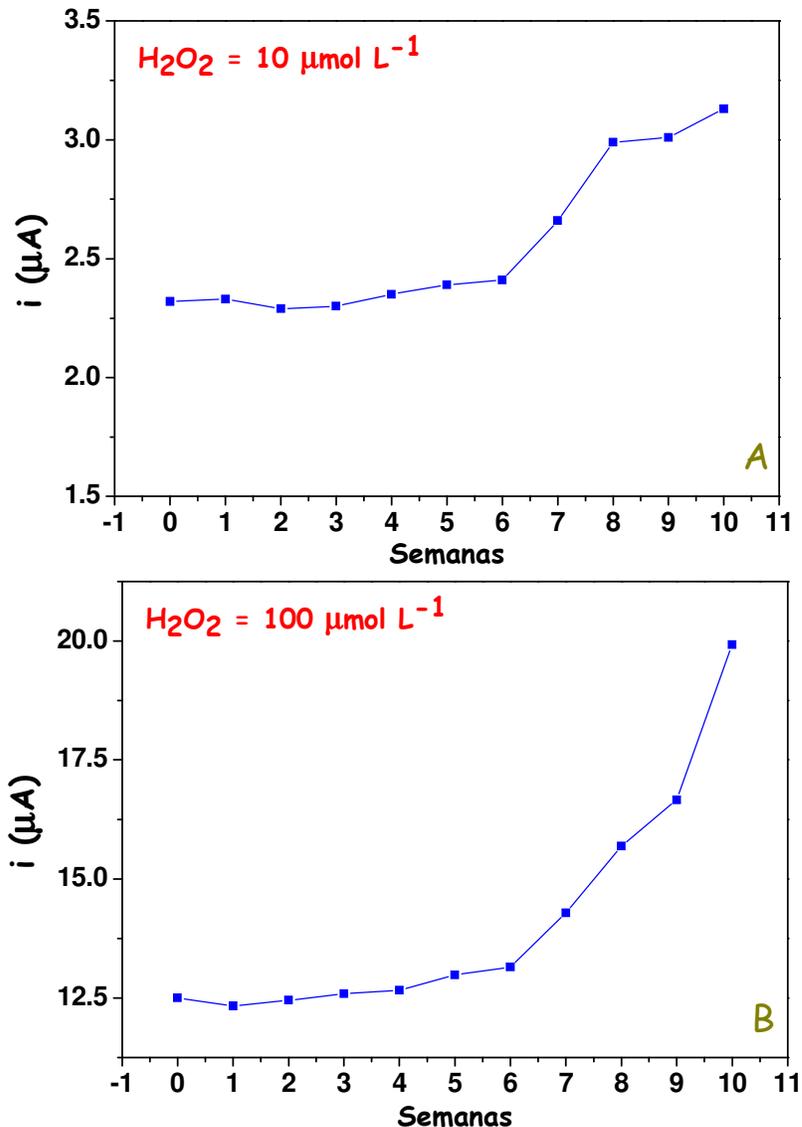


Figura 77: Estabilidade do reator imobilizado frente estocagem à -20°C e sua posterior reutilização, em semanas. Dados: 30 injeções semana $^{-1}$; (A) $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, caminho percorrido 53 cm , solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

Face a esta habilidade de reaproveitamento enzimático, criou-se um protocolo de reutilização e estocagem do reator tubular, a fim de estudar seu comportamento mediante várias condições de análise e a manutenção de suas propriedades catalíticas (figura 78).



NUPIS
Núcleo de Pesquisa em Instrumentação e
Separações Analíticas

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
NÚCLEO DE PESQUISAS EM INSTRUMENTAÇÃO E SEPARAÇÕES ANALÍTICAS
(NUPIS)



PROCOLO DE ESTOCAGEM DOS REATORES TUBULARES ENZIMÁTICOS

OBJETIVOS

Estabelecer parâmetros para condicionamento e reutilização de reatores tubulares enzimáticos;
Avaliar a perda da atividade enzimática conforme parâmetros e metodologia utilizados.

ENZIMA

Catalase (ou hidropoxidase) E.C. 1.11.1.6 (2950 UI mg⁻¹) - Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, USA).

COMPOSIÇÃO DO REATOR TUBULAR

Amberlite IRA-743 – GLUTARALDEÍDO – CATALASE.

PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO

A resina Amberlite IRA-743 (250 mg), escolhida como suporte, foi inicialmente tratada com 100 µL de glutaraldeído 0,1 % (IRA - GLU), por 10 minutos, sob constante agitação, depois montou-se o reator tubular com um tubo de polietileno ($\phi = 0,26$ cm, 2,2 cm de comprimento) com as extremidades preenchidas com pequenos chumaços de algodão para evitar a perda de material. Acoplou-se o reator enzimático ao sistema FIA e com uma vazão controlada por uma bomba peristáltica em 1,5 mL min⁻¹, 25,00 mL de uma solução diluída de padrão catalase em balão volumétrico com tampão fosfato pH 7,4 passou pelo reator em cerca de 17 minutos de operação do sistema. O procedimento formou, ao final, unido por ligações covalentes, o composto resina Amberlite IRA-743, glutaraldeído e catalase (IRA – GLU – CAT). Posteriormente, no próprio sistema em fluxo lavou-se o reator enzimático com solução tampão fosfato para eliminar o excesso de reagente.

METODOLOGIA

Determinação amperométrica de catalase através do consumo de padrões de H₂O₂ por análise de injeção em fluxo em amostras de mel.

p.1/3

Figura 78: Protocolo de estocagem dos reatores tubulares enzimáticos - CATALASE.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**NÚCLEO DE PESQUISAS EM INSTRUMENTAÇÃO E SEPARAÇÕES ANALÍTICAS
(NUPIS)**

NÚMERO e CONDIÇÕES FINAIS DE ANÁLISE

30 injeções / análise / semana.

Dados: volume de injeção 200 μL , vazão 1,5 mL min^{-1} , caminho percorrido 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado + 0,60 V vs. Ag/AgCl_(sat).

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Perda da atividade enzimática por agentes desnaturantes como temperatura, pH, excesso de substrato e reações paralelas com outras espécies químicas.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

SEMANA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (%)	PERDA (%)
0-6	100%	-
7	86%	14%
8	72%	28%
9	71%	29%
10	66%	34%
[H₂O₂] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$		

SEMANA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (%)	PERDA (%)
0-4	100%	-
5	96%	4%
6	95%	5%
7	86%	14%
8	75%	25%
9	67%	33%
10	41%	59%
[H₂O₂] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$		

CONCLUSÕES

A enzima manteve suas atividades enzimáticas quase que totais durante sete e cinco semanas de análise, para as concentrações de H₂O₂ a 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Nas semanas seguintes houve uma perda substancial de atividade de 14 a 34%; e 4 a 59%, para o primeiro e segundo teor de peróxido de hidrogênio.

DESACONSELHA-SE o uso do reator enzimático, nas condições estabelecidas, a partir da 8^a e 6^a semana de análise, respectivamente, para as concentrações supracitadas, por diminuição da atividade catalítica total da catalase.

p.2/3

Figura 78: continuação.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



NÚCLEO DE PESQUISAS EM INSTRUMENTAÇÃO E SEPARAÇÕES ANALÍTICAS
(NUPIS)

	NOME	ASSINATURA	DATA
Elaborado por	<i>Romulo Augusto de Abreu Franchini</i>		
Aprovado por	<i>Renato Camargo Matos</i>		
Revisado por	<i>Renato Camargo Matos</i>		

A possibilidade de reutilização do suporte para a imobilização enzimática foi avaliada como no trabalho com a peroxidase. Da mesma maneira que as enzimas, as resinas de troca iônica representam uma boa parcela de custo para este trabalho. Avaliar seu recondicionamento e desenvolver protocolos, portanto, é tarefa importante para uma economia final de gastos. O teste destacou a capacidade de reciclagem da resina Amberlite IRA-743 para novas imobilizações enzimáticas com a catalase, sem a perda da capacidade reacional. Após o experimento, retirou-se a resina do reator tubular e procedeu a sua lavagem com tampão fosfato pH 7,4 e secagem em estufa a 100°C por 30 minutos. Então, a Amberlite IRA-743 foi novamente imobilizada com a enzima catalase e glutaraldeído (item 6.2.3.) e um novo teste executado levando em conta os mesmos parâmetros instrumentais do experimento anterior, com 30 análises e medidas da corrente de oxidação do H_2O_2 . A figura 79 mostra que o procedimento de reutilização foi viável e a resina apresentou a mesma capacidade de imobilização e a atividade enzimática da catalase foi mantida. Os CVs das medidas iniciais ficaram em 4% ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 5% ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e para a resina reutilizada foram de 5% ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 4% ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$) após lavagem, secagem e nova imobilização.

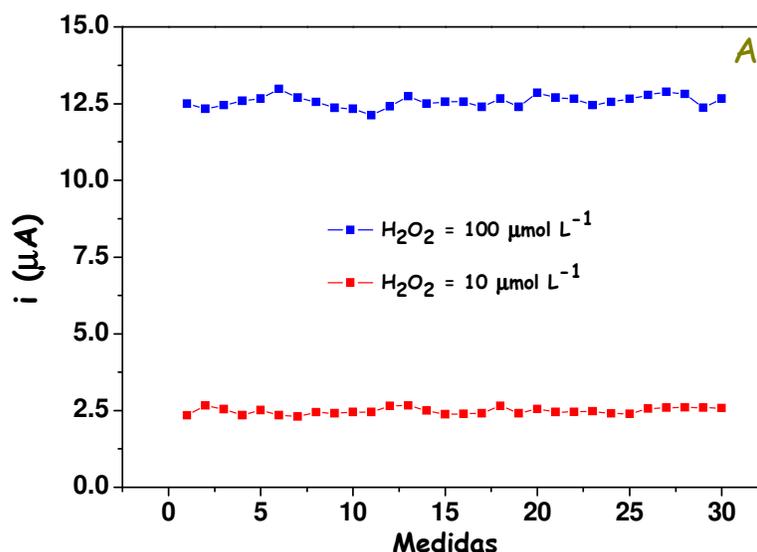


Figura 79: Teste de reutilização da resina Amberlite IRA-743 com nova imobilização enzimática da catalase, após lavagem e secagem do suporte em estufa por 100°C. Dados: (A) Imobilização em resina nova e (B) Imobilização em resina reutilizada; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção 200 μL , vazão 1,5 mL min^{-1} , caminho percorrido 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado + 0,60 V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$.

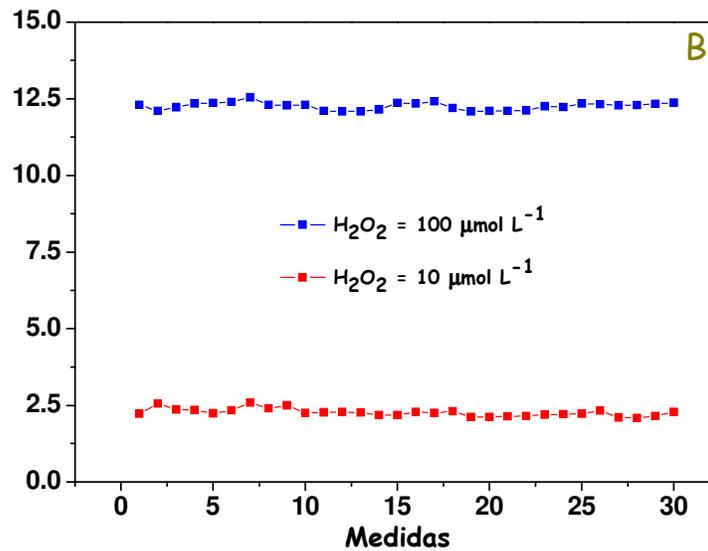


Figura 79: continuação.

O acondicionamento da resina também foi estudado frente ao número de reciclagens e reutilizações. Verificou-se que a Amberlite IRA-743 manteve suas propriedades imobilizadoras até a 10^a reutilização, após esta; a atividade enzimática ficou comprometida, devido às falhas no processo de imobilização. Muito provavelmente, este efeito se deve, a possíveis alterações estruturais nos sítios ativos da Amberlite IRA-743. Trinta injeções foram escolhidas para cada análise, os CVs ficaram abaixo de 5%. Considerando que da 1^a a 10^a análise a atividade da catalase, manteve-se praticamente em 100 %; da 11^a a 15^a e da 16^a a 20^a, houve uma perda substancial de 34% a 62% e 26% a 55%, respectivamente, para as concentrações de H₂O₂ de 10 e 100 µmol L⁻¹ (figura 80).

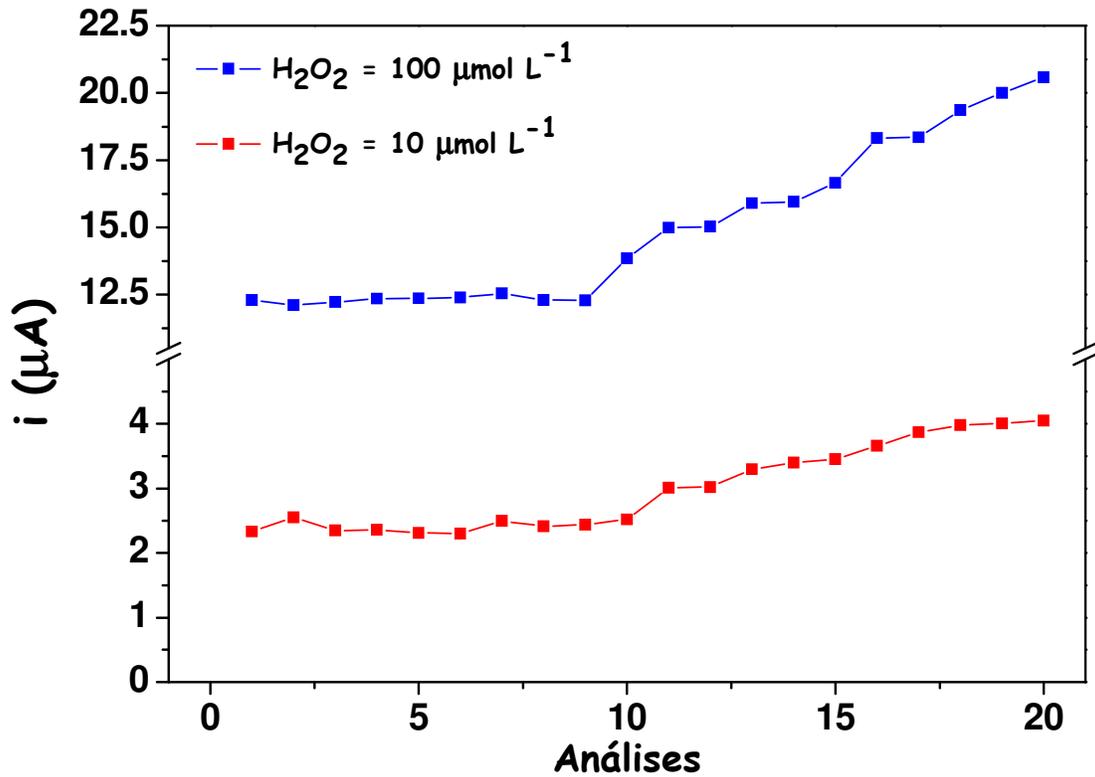


Figura 80: Vinte reutilizações da resina Amberlite IRA-743 para imobilização da enzima catalase. Dados: 30 injeções análise⁻¹; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10$ e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, caminho percorrido 53 cm , solução tampão fosfato pH $7,4$ e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

Novamente foi criado um protocolo de recondicionamento, desta vez da resina utilizada como suporte nas imobilizações enzimáticas para a catalase (figura 81).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



NÚCLEO DE PESQUISAS EM INSTRUMENTAÇÃO E SEPARAÇÕES ANALÍTICAS
(NUPIS)

PROTOCOLO DE REUTILIZAÇÃO DE RESINAS OU SUPORTES

OBJETIVOS

Estabelecer parâmetros para reutilização de resinas ou suportes que auxiliem nas imobilizações enzimáticas e construções de reatores tubulares;

Avaliar a eficiência perda da atividade enzimática conforme parâmetros e metodologia.

RESINA / TIPO

- Amberlite IRA-743 Amberlite IRA-120 Amberlite IRA-400
 Sílica Aminopropilada Sílica Sílica Porosa
 Capilar Sílica Fundida Resina Metacrilato Aminopropil-CPG
 Outros: _____

Resina aniônica poliestirênica com grupo funcional metilglucamina.

ORIGEM

Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, USA).

COMPOSIÇÃO DO REATOR TUBULAR

Amberlite IRA-743 – GLUTARALDEÍDO – CATALASE.

PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO

A resina Amberlite IRA-743 (250 mg), escolhida como suporte, foi inicialmente tratada com 100 µL de glutaraldeído 0,1 % (IRA - GLU), por 10 minutos, sob constante agitação, depois montou-se o reator tubular com um tubo de polietileno ($\phi = 0,26$ cm, 2,2 cm de comprimento) com as extremidades preenchidas com pequenos chumaços de algodão para evitar a perda de material. Acoplou-se o reator enzimático ao sistema FIA e com uma vazão controlada por uma bomba peristáltica em $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, 25,00 mL de uma solução diluída de padrão catalase em balão volumétrico com tampão fosfato pH 7,4 passou pelo reator em cerca de 17 minutos de operação do sistema. O procedimento formou, ao final, unido por ligações covalentes, o composto resina Amberlite IRA-743, glutaraldeído e catalase (IRA – GLU – CAT). Posteriormente, no próprio sistema em fluxo lavou-se o reator enzimático com solução tampão fosfato para eliminar o excesso de reagente.

Figura 81: Protocolo de reutilização de resinas ou suportes.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**NÚCLEO DE PESQUISAS EM INSTRUMENTAÇÃO E SEPARAÇÕES ANALÍTICAS
(NUPIS)**

METODOLOGIA

Determinação amperométrica de catalase através do consumo de padrões de H_2O_2 por análise de injeção em fluxo em amostras de mel.

NÚMERO e CONDIÇÕES FINAIS DE ANÁLISE

30 injeções / análise.

Dados: volume de injeção 200 μL , vazão 1,5 $mL\ min^{-1}$, caminho percorrido 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado + 0,60 V vs. $Ag/AgCl_{(sat)}$.

PROCEDIMENTO DE SECAGEM

Após a análise, retirar o composto suporte-enzima do reator tubular com auxílio de uma seringa comercial de polietileno, sem agulha, e coletar em um béquer de 10 mL. Lavar exaustivamente com solução tampão fosfato pH 7,4. Drenar, com máximo cuidado, o excesso de eletrólito que, porventura, tenha ficado no béquer, e colocar o mesmo em uma estufa (315-E da Fanem[®], São Paulo, SP) à 100 °C por 30 minutos.

Após este período, proceder nova imobilização como descrito anteriormente.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Perda mecânica ou desperdício da resina ao preparar e/ou retirar o suporte do reator tubular enzimático.

Secagem em temperaturas e períodos acima do estabelecido.

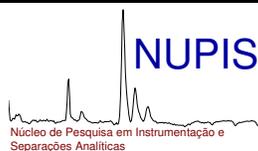
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA / INJEÇÕES

Esta avaliação tem como objetivo avaliar a manutenção da atividade enzimática em 30 injeções sucessivas de H_2O_2 .

INJEÇÕES	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (%)			
	Imobilização Tradicional		Imobilização Resina Reutilizada	
	$[H_2O_2] = 10\ \mu mol\ L^{-1}$	$[H_2O_2] = 100\ \mu mol\ L^{-1}$	$[H_2O_2] = 10\ \mu mol\ L^{-1}$	$[H_2O_2] = 100\ \mu mol\ L^{-1}$
5				
10				
15				
20				
25				
30	100%	100%	98%	91%
35				
40				
45				
50				

p.2/4

Figura 81: continuação.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



NÚCLEO DE PESQUISAS EM INSTRUMENTAÇÃO E SEPARAÇÕES ANALÍTICAS
(NUPIS)

INJEÇÕES	PERDA	
	$[H_2O_2] = 10 \mu mol L^{-1}$	$[H_2O_2] = 100 \mu mol L^{-1}$
5		
10		
15		
20		
25		
30	2%	9%
35		
40		
45		
50		

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA / ANÁLISES

Esta avaliação tem como objetivo verificar a manutenção da atividade enzimática em grupos de análises com 30 injeções cada de H_2O_2 a 10 e 100 $\mu mol L^{-1}$.

ANÁLISES	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (%)	
	Imobilização Resina Reutilizada	
	$[H_2O_2] = 10 \mu mol L^{-1}$	$[H_2O_2] = 100 \mu mol L^{-1}$
1 ^a a 10 ^a	100%	100%
11 ^a a 15 ^a	66%	74%
16 ^a a 20 ^a	38%	45%

ANÁLISES	PERDA (%)	
	$[H_2O_2] = 10 \mu mol L^{-1}$	$[H_2O_2] = 100 \mu mol L^{-1}$
1 ^a a 10 ^a	-	-
11 ^a a 15 ^a	34%	26%
16 ^a a 20 ^a	62%	55%

CONCLUSÕES

A atividade enzimática manteve-se praticamente constante nas 30 análises, com a perda de ação catalítica de 2% e 9% para as concentrações injetadas de H_2O_2 a 10 e 100 $\mu mol L^{-1}$, comprovando que a lavagem, secagem e reutilização da resina Amberlite IRA-743 é um procedimento viável, em termos de economia, mantendo-se a confiabilidade da metodologia.

Nas subseqüentes reutilizações, a resina manteve suas propriedades de suporte até a 10^a reciclagem, após esta; a atividade enzimática ficou comprometida, devido a falhas no processo de imobilização enzimática. Muito provavelmente, este efeito se deve, a possíveis alterações estruturais nos sítios ativos da Amberlite IRA-743.

DESACONSELHA-SE a imobilização enzimática com reciclagem da resina Amberlite IRA-743 após a 13^a reutilização por diminuição da atividade catalítica total da catalase.

p.3/4

Figura 81: continuação.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



NÚCLEO DE PESQUISAS EM INSTRUMENTAÇÃO E SEPARAÇÕES ANALÍTICAS
(NUPIS)

	<i>NOME</i>	<i>ASSINATURA</i>	<i>DATA</i>
Elaborado por	<i>Romulo Augusto de Abreu Franchini</i>		
Aprovado por	<i>Renato Camargo Matos</i>		
Revisado por	<i>Renato Camargo Matos</i>		

6.3.3. Estudo da Influência da Temperatura

O estudo teve como objetivo verificar a estabilidade da enzima catalase em diferentes temperaturas. Para o experimento foram construídos 4 reatores enzimáticos, (CAT = 600 UI mL⁻¹) os quais foram introduzidos separadamente em um banho termostático em 4 valores diferentes de temperaturas por 30 minutos: 20 °C, 40 °C, 60 °C e 80 °C. A figura 82 mostra que em temperaturas elevadas (acima de 40 °C) há uma tendência natural de desnaturação da enzima e conseqüentemente menor consumo de H₂O₂, assim a melhor atividade enzimática foi observada com uma temperatura de 20 °C.

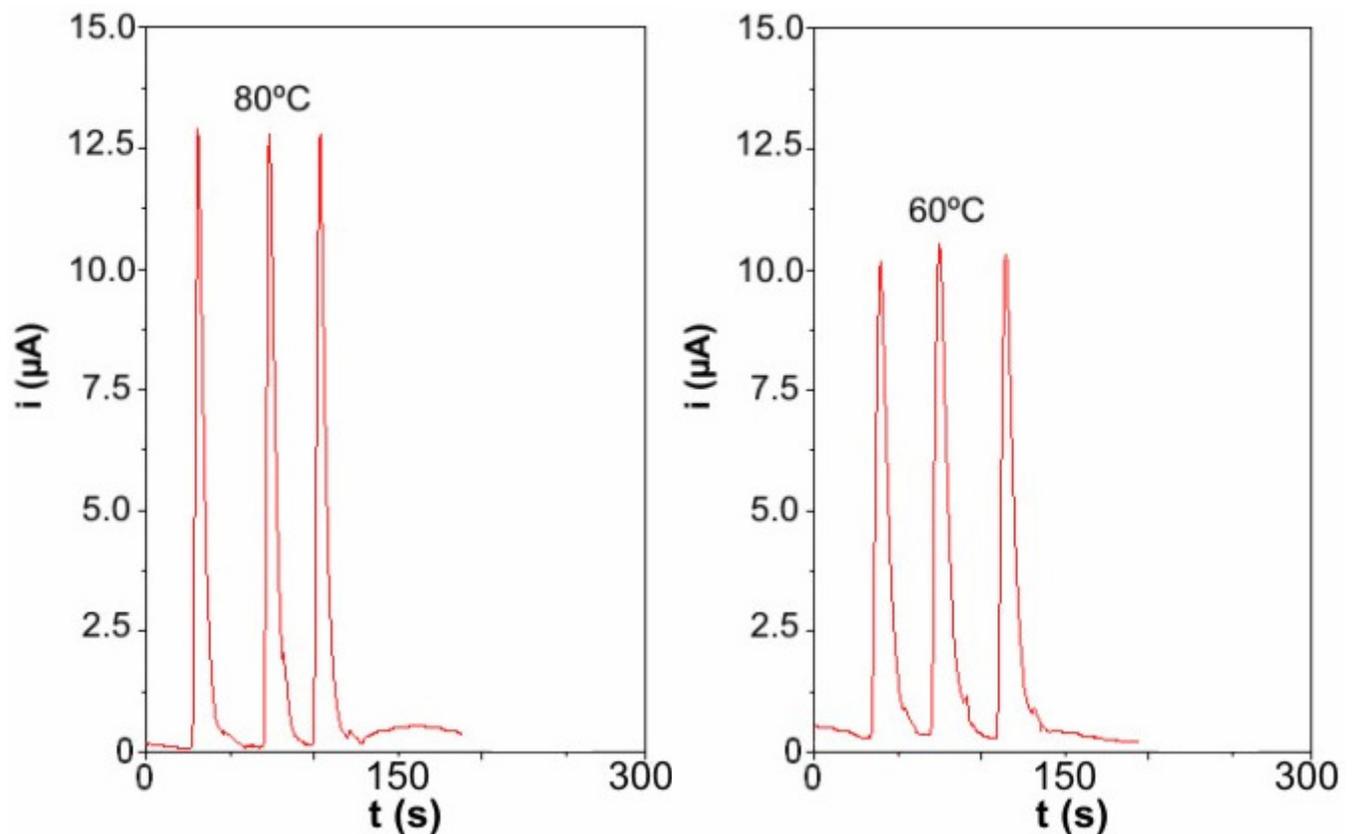


Figura 82: Estudo da influência da temperatura no sistema enzimático e no consumo de H₂O₂ pela catalase. Dados: [H₂O₂] = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, volume de injeção 200 μL , vazão 1,5 mL min⁻¹, caminho percorrido 53 cm, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado + 0,60 V vs. Ag/AgCl_(sat).

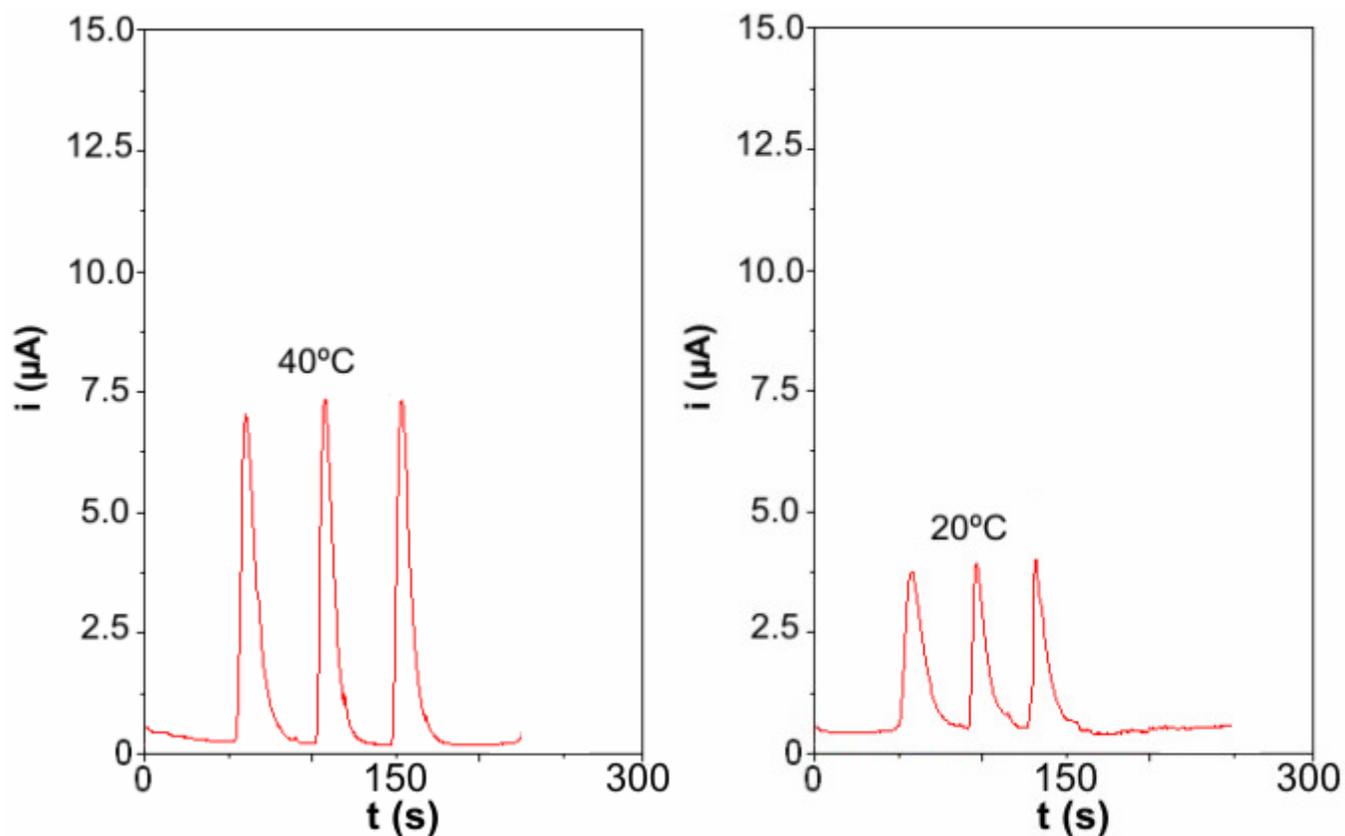


Figura 82: continuação.

6.3.4. Curva Analítica

Após otimização dos parâmetros analíticos foi construída a curva analítica para a quantificação da catalase no mel. A curva analítica, além de validar a sensibilidade e confiabilidade do método, teve como objetivo mostrar a correlação linear entre o decréscimo da corrente de oxidação do H_2O_2 e a concentração dos padrões de catalase imobilizados no reator tubular. Solução padrão estoque de catalase a 5000 UI mL^{-1} foi preparada em um balão volumétrico de 200,00 mL pesando, aproximadamente, 339 mg da enzima. Desta, 10 soluções padrões de catalase foram preparadas, com concentrações variando de 100 a 5000 UI mL^{-1} em balões de 25,00 mL que posteriormente foram injetadas no sistema em fluxo, em vazão constante de 1,5 mL

min^{-1} , com reator tubular contendo resina Amberlite IRA-743 e glutaraldeído, para a imobilização da catalase. O item 6.2.3. resume tal procedimento e quantidade de enzima transferida da solução padrão estoque para os balões de 25,00 mL e as respectivas concentrações finais foram utilizadas:

- Balão 00: 0,00 mL + solução tampão fosfato qsp: [Catalase] = 0 UI mL^{-1} ;
- Balão 01: 0,50 mL + solução tampão fosfato qsp: [Catalase] = 100 UI mL^{-1} ;
- Balão 02: 1,00 mL + solução tampão fosfato qsp: [Catalase] = 200 UI mL^{-1} ;
- Balão 03: 2,00 mL + solução tampão fosfato qsp: [Catalase] = 400 UI mL^{-1} ;
- Balão 04: 3,00 mL + solução tampão fosfato qsp: [Catalase] = 600 UI mL^{-1} ;
- Balão 05: 4,00 mL + solução tampão fosfato qsp: [Catalase] = 800 UI mL^{-1} ;
- Balão 06: 5,00 mL + solução tampão fosfato qsp: [Catalase] = 1000 UI mL^{-1} ;
- Balão 07: 10,00 mL + solução tampão fosfato qsp: [Catalase] = 2000 UI mL^{-1} ;
- Balão 08: 15,00 mL + solução tampão fosfato qsp: [Catalase] = 3000 UI mL^{-1} ;
- Balão 09: 20,00 mL + solução tampão fosfato qsp: [Catalase] = 4000 UI mL^{-1} ;
- Balão 10: 25,00 mL: [Catalase] = 5000 UI mL^{-1} .

O balão citado como 00 foi considerado como o branco, isto é, nenhuma concentração padrão de catalase estaria presente no reator tubular. Solução padrão de H_2O_2 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi escolhida para as medidas amperométricas, volume de injeção 200 μL , vazão 1,5 mL min^{-1} e potencial aplicado + 0,60 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$ foram mantidos e usados neste experimento. A curva apresentou ótima sensibilidade analítica, obtendo limites de detecção ($s_b + 3s$) e quantificação ($s_b + 10s$), calculados em função dos sinais de oxidação do H_2O_2 na ausência da catalase imobilizada, respectivamente de 38 e 51 UI mL^{-1} . A figura 83 mostra o diagrama da variação da corrente do padrão de H_2O_2 injetado no sistema FIA em função da catalase imobilizada, com a quebra dos valores de 200, 400 e 800 UI mL^{-1} , no eixo correspondente às concentrações da enzima imobilizada. Dentre as vantagens, a alta estabilidade e elevada sensibilidade na resposta do detector permitiram medir o decréscimo da corrente de oxidação do H_2O_2 e estimar a concentração da catalase, a partir da curva analítica, de forma rápida e precisa nas amostras de mel.

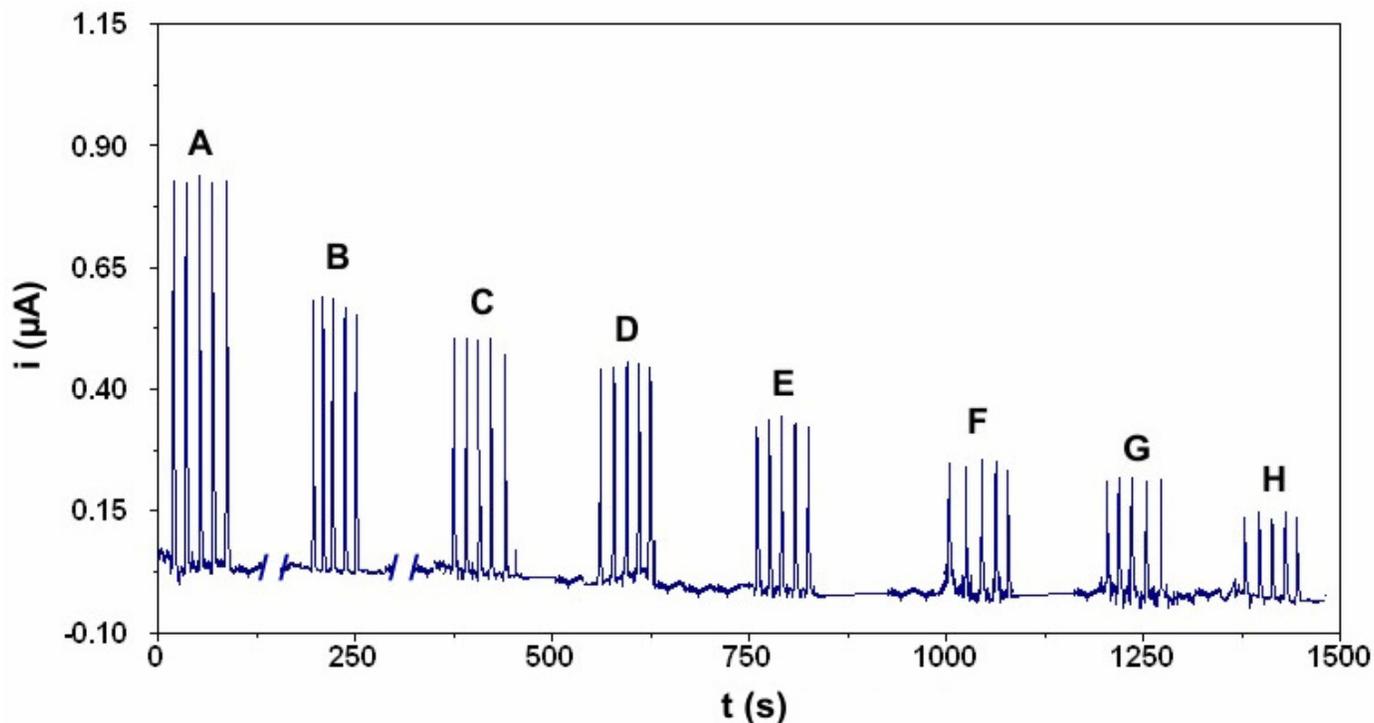


Figura 83: Registros amperométricos para as injeções sucessivas de H_2O_2 no sistema FIA contendo padrões de catalase imobilizada em reator tubular: (A) 0, (B) 100, (C) 600, (D) 1000, (E) 2000, (F) 3000, (G) 4000 e (H) 5000 UI mL^{-1} . Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, percurso analítico 53 cm , volume de injeção $200 \mu\text{L}$, solução tampão fosfato pH 7,4 e potencial aplicado $+0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

A figura 84 ilustra a curva analítica obtida para diferentes atividades da catalase imobilizada no reator tubular frente ao padrão de H_2O_2 injetado. De forma semelhante à figura 85 é mostrada a curva analítica levando em conta o cálculo diferencial entre a corrente de oxidação do padrão de H_2O_2 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) sem passar pelo reator ($0,797 \mu\text{A}$) e as correntes de oxidação obtidas, para a mesma concentração de peróxido, quando submetido ao sistema FIA contendo padrões de catalase imobilizados no reator tubular.

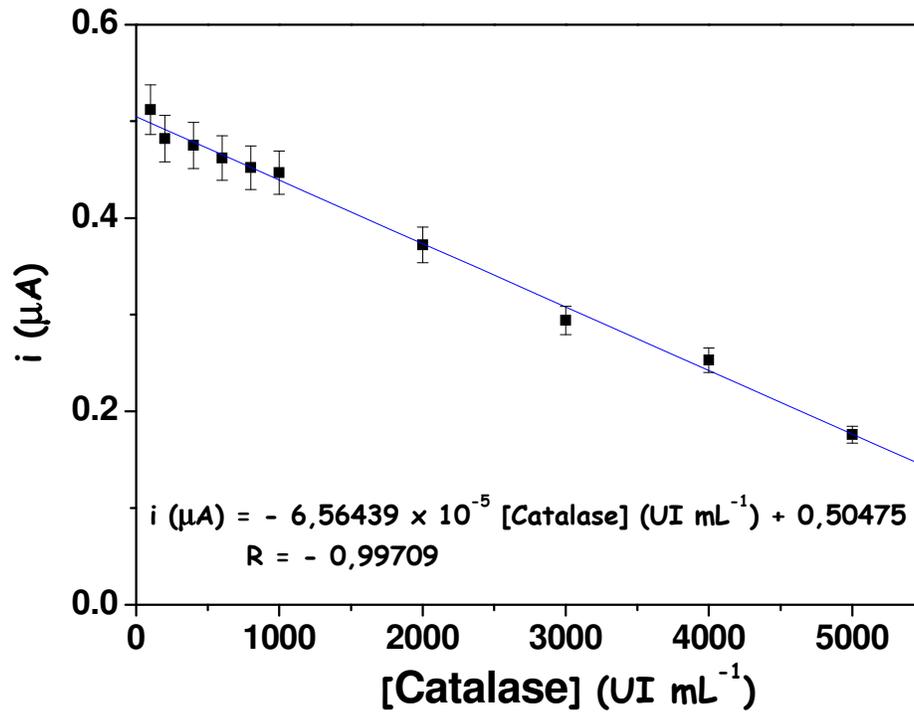


Figura 84: Curva analítica para a determinação amperométrica dos teores de catalase com concentrações variando entre 100 e 5000 UI mL^{-1} .

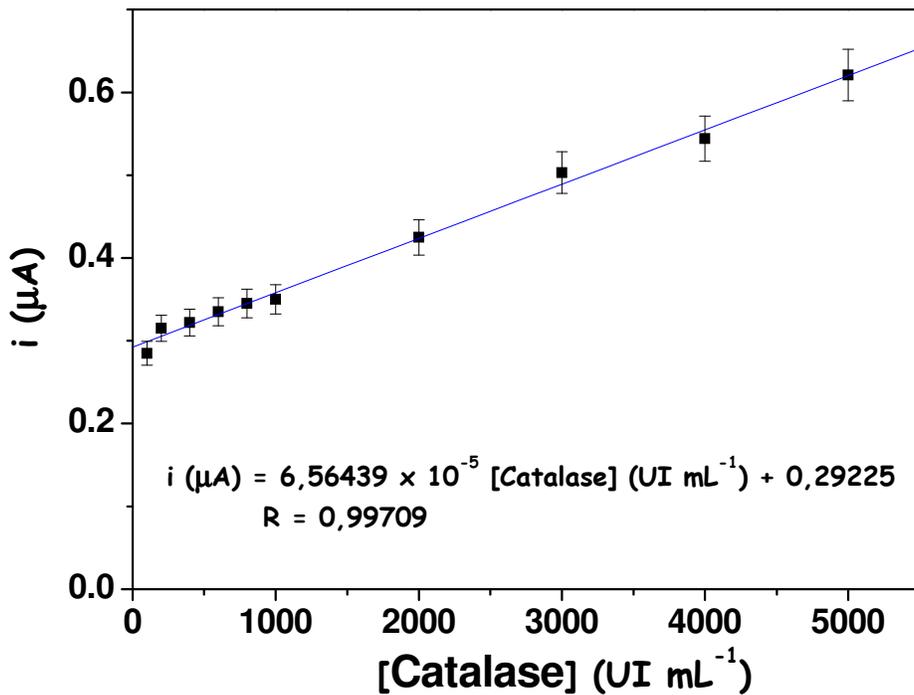


Figura 85: Curva analítica para a determinação amperométrica diferencial dos teores de catalase com concentrações variando entre 100 e 5000 UI mL^{-1} .

6.3.5. Quantificação dos Teores de Catalase em Amostras de Mel e Testes de Recuperação

A imobilização da catalase presente nas amostras de mel foi feita como o proposto no item 6.2.3. As amostras foram diluídas com solução tampão fosfato para um volume final de 25,00 mL e com concentrações aproximadas de 10% (m/v). Com uma simples filtração, o conteúdo total dos balões foi integralmente injetado no sistema em fluxo para a imobilização da enzima proveniente dos exemplares de mel. Foram obtidos 17 reatores tubulares, cada qual com seu equivalente de concentração de catalase para cada amostra. Diante disso procederam-se duas injeções de padrão de H_2O_2 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$: (A) no sistema FIA sem a presença do reator enzimático e (B) no sistema FIA na presença do reator enzimático imobilizado com catalase presente no mel. Registrou-se a diferença da corrente gerada entre (A) e (B). Posteriormente, calculou-se o teor da catalase em UI mL^{-1} , usando a curva analítica para as 17 amostras comerciais de mel:

Dada a equação da reta:

$$i (\mu\text{A}) = b \cdot [\text{Catalase}] (\text{UI mL}^{-1}) + a$$

Onde b = coeficiente angular e a = o coeficiente linear da reta.

O teor de catalase nas amostras de mel em UI mg^{-1} foi determinado pela seguinte relação matemática:

$$C_{\text{Catalase}} (\text{UI mg}^{-1}) = \frac{i(\mu\text{A}) - a}{b \cdot 40 \cdot m_{\text{mel}}}$$

m_{mel} é a massa de mel pesada e diluída nos balões volumétricos de 25,00 mL e 40 o fator de diluição das amostras.

Levando-se em conta a reta apresentada na figura 85, o teor de catalase (UI mg^{-1}) nas amostras de mel foi determinado pela:

$$C_{\text{Catalase (UI mg}^{-1})} = \frac{[0,797 - i(\mu\text{A})] - a}{40 \cdot m_{\text{mel}}}$$

Os diagramas para a análise da catalase nas amostras são mostrados na figura 86. Destacamos os registros amperométricos de três amostras de mel analisadas neste trabalho (Cassutinga, Bracatinga e Eucalipto Teresópolis) na cor azul, enquanto em vermelho encontra-se os sinais amperométricos referente ao padrão de H_2O_2 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ sem passar pelo reator enzimático.

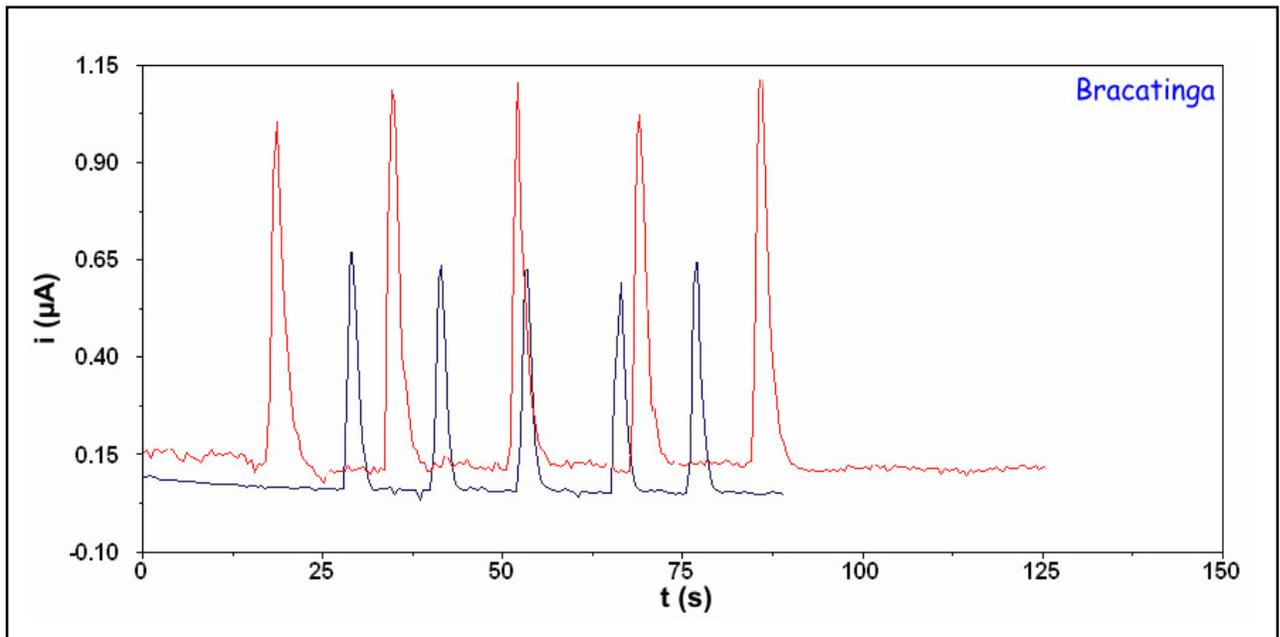


Figura 86: Diagramas para a determinação amperométrica de catalase nas amostras de mel. Em azul, sinais amperométricos referente ao consumo do padrão de H_2O_2 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) pela catalase presente nas amostras; em vermelho, os sinais referentes ao mesmo padrão de H_2O_2 , sem passar pelo reator enzimático.

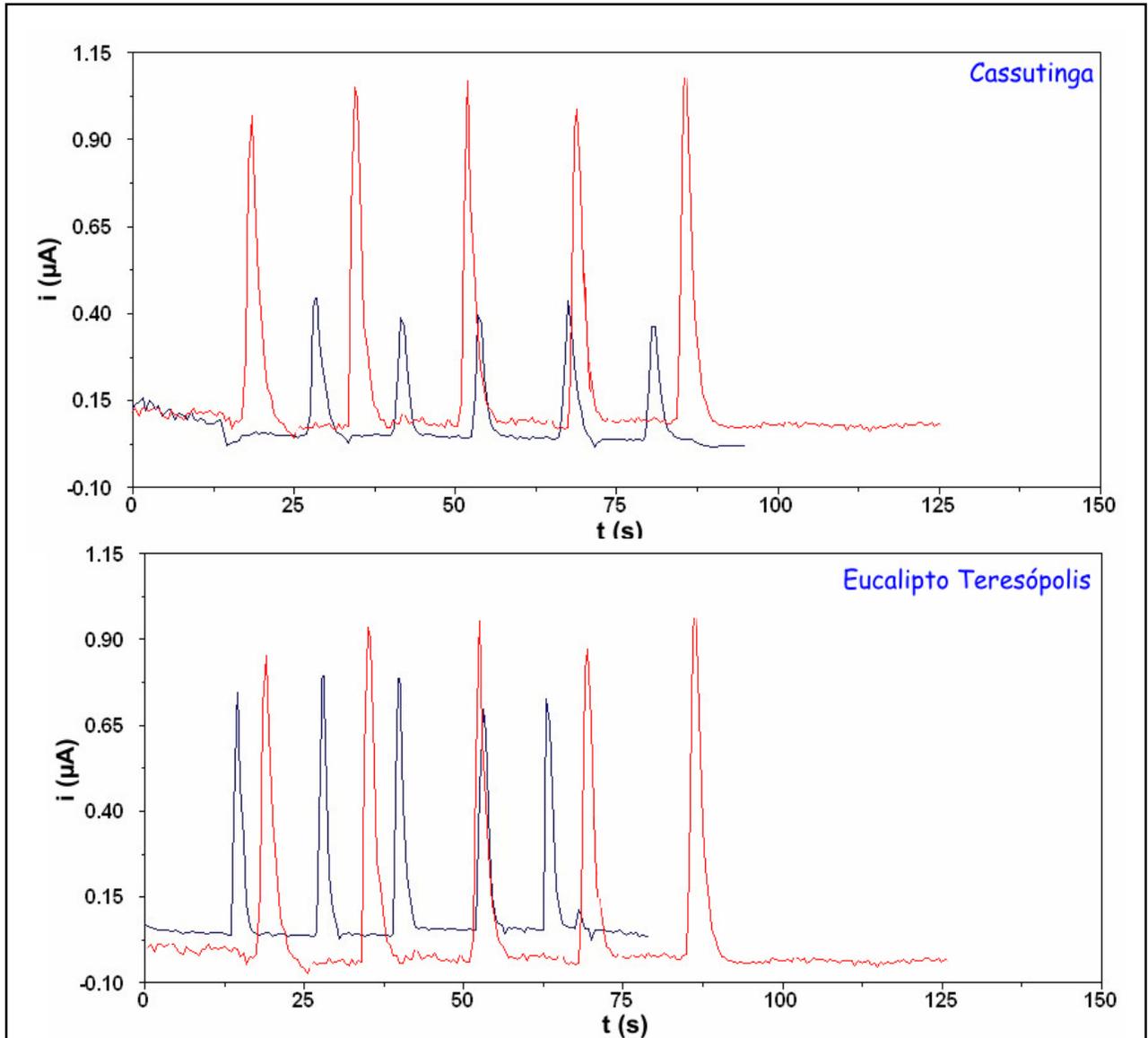


Figura 86: continuação.

Para os testes de recuperação mesmo procedimento foi adotado. A cada amostra um padrão de 500 UI mL^{-1} de catalase foi adicionado para ser imobilizado juntamente com a enzima proveniente do mel. A mesma concentração de H_2O_2 foi usada nas injeções em fluxo para os registros amperométricos na presença e ausência dos reatores tubulares. O teor de recuperação foi estipulado pela equação:

Teor de recuperação (%) =

$$= \frac{(C_{\text{Catalase(UI mL}^{-1})} \text{ amostra fortificada} - C_{\text{Catalase(UI mL}^{-1})} \text{ amostra})}{C_{\text{Catalase(UI mL}^{-1})} \text{ adicionado à amostra fortificada}} \cdot 100$$

A tabela 14 mostra as concentrações de catalase (UI mg⁻¹), o intervalo de confiança (μ) para $\alpha = 0,05\%$ ou 95% de confiabilidade, o coeficiente de variância (CV) e o resultado dos testes de recuperação para as medidas amperométricas das 17 amostras de mel. As concentrações de catalase variaram de 9,97 a 99,07 UI mg⁻¹, enquanto que os resultados de recuperação variaram de 87% a 114%.

Tabela 14: Concentrações de Catalase (UI mg⁻¹), intervalos de confiança ($\alpha = 0,05\%$), coeficientes de variância (CV) e o resultado dos testes de recuperação para as medidas amperométricas das 17 amostras de mel.

Amostra	Origem Botânica / Geográfica	Catalase (UI mg⁻¹)	CV (%)	Recuperação (%)
1	<i>Manuka +5 / Nova Zelândia</i>	78,51 ± 1,50	1,23	87
2	<i>Laranjeira / Japão</i>	30,73 ± 2,02	2,85	113
3	<i>Rengue / Japão</i>	19,16 ± 1,09	2,25	96
4	<i>Cassutinga / F.Santana (BA)</i>	99,07 ± 2,16	6,17	103
5	<i>Velame / Sta Bárbara (MG)</i>	35,50 ± 2,08	3,45	109
6	<i>Morrão de Candeia / Teresópolis (RJ)</i>	24,26 ± 1,00	4,61	111
7	<i>Bracatinga / Teresópolis (RJ)</i>	97,44 ± 1,02	3,92	97
8	<i>Cipó-Uva / Teresópolis (RJ)</i>	93,80 ± 1,45	7,41	106
9	<i>Laranjeira / Teresópolis (RJ)</i>	69,04 ± 0,99	2,04	97
10	<i>Laranjeira / Juiz de Fora (MG)</i>	67,55 ± 1,30	3,37	103
11	<i>Assa Peixe / Teresópolis (RJ)</i>	71,73 ± 0,55	1,14	98
12	<i>Assa Peixe / Juiz de Fora (MG)</i>	72,91 ± 1,32	2,75	99
13	<i>Silvestre / Teresópolis (RJ)</i>	64,43 ± 0,39	1,05	105
14	<i>Silvestre / Viçosa (MG)</i>	51,86 ± 2,99	4,02	114
15	<i>Eucalipto / Teresópolis (RJ)</i>	9,97 ± 0,08	3,51	97
16	<i>Eucalipto / Juiz de Fora (MG)</i>	58,89 ± 0,02	0,48	106
17	<i>Mel Abelha Jataí / Campinas (SP)</i>	52,76 ± 0,05	0,82	109
<i>Média</i>	-	58,68	2,66	103
<i>V max</i>	-	99,07	7,41	114
<i>V min</i>	-	9,97	0,48	87

6.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia amperométrica associada a análise por injeção em fluxo e a imobilização enzimática demonstrou uma grande potencialidade na determinação de catalase frente a matrizes complexas como o mel. No caso, a enzima catalase pode ser quantificada, algo inédito até então, em trabalhos com esse tipo de amostra. A técnica foi uma adaptação do estudo apresentado no capítulo 5, onde a maioria dos parâmetros FIA foram seguidos.

O estudo da imobilização da catalase em diferentes resinas revelou mais uma vez que a Amberlite IRA-743 foi o melhor suporte para esse tipo de análise. Outras resinas como Amberlite IRA-120 e IRA-400, quando submetidas ao processo de imobilização se mostram incapazes de imobilizar a enzima com boa atividade catalítica, o que deve estar relacionado a características inerentes à sua estrutura química. A atividade enzimática também ficou comprometida em valores elevados de temperatura, o que sugere a desnaturação da catalase, necessitando que o desenvolvimento do trabalho seja realizado em temperatura ambiente. A bomba peristáltica, apesar de ser um dispositivo de custo elevado, quando comparado aos mini-compressores de ar, teve que ser usada neste trabalho, pois na etapa da imobilização enzimática foi fundamental um fluxo constante para evitar outras variáveis no sistema.

O sistema enzimático demonstrou significativa estabilidade frente a injeções sucessivas de H_2O_2 , em pelo menos 30 análises, diante de concentrações de peróxido de 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Sua estocagem e nova reutilização da enzima apontou que para concentrações mais altas de H_2O_2 o reator poderia ser usado pelo menos por 5 semanas, enquanto para os menores teores por 7 semanas, em sequência de 50 injeções cada. Igualmente à pesquisa com a peroxidase a reciclagem da resina Amberlite IRA-743 apresentou-se proveitosa com a economia deste suporte. Com 30 injeções por análise e até 10 reciclagens, a resina manteve suas propriedades para a formação das ligações covalentes com o glutaraldeído e a catalase. Novamente, desenvolveram-se protocolos de estocagem do reator tubular e de reciclagem da resina

Amberlite IRA-743 como procedimento operacional padrão de trabalho, durante as análises em laboratório.

Com a otimização dos principais parâmetros da metodologia obteve-se uma curva analítica bastante precisa com elevado grau de concordância para a determinação da catalase nas amostras de mel. A ampla faixa de linearidade da reta (100 a 5000 UI mL⁻¹) e coeficiente de regressão linear igual a 0,997 provaram a correlação entre o decréscimo da corrente de oxidação do H₂O₂ e a concentração da enzima. Valores baixos de limite de detecção (38 UI mL⁻¹) e quantificação (51 UI mL⁻¹) demonstraram a sensibilidade da metodologia amperométrica nesse tipo de determinação. Durante a quantificação da catalase nas amostras de mel os resultados variaram entre 9,97 UI mg⁻¹ (Eucalipto Teresópolis) e 99,07 UI mg⁻¹ (Cassutinga), com valores médios da enzima para as 17 amostras analisadas de 58,68 UI mg⁻¹. Os experimentos apresentaram coeficientes de variância e recuperação médios de 3% e 103%, respectivamente. A amperometria diferencial provou ser uma técnica com alta sensibilidade, precisão, robustez e elevada frequência analítica (cerca de 90 determinações h⁻¹) na determinação dos teores de catalase em amostras comerciais de mel.

Para uma avaliação geográfica, os mesmos grupos do capítulo 5 foram utilizados neste estudo. Verificou-se que as amostras classificadas como “outras” obtiveram maiores valores catalase, 75,92 UI mg⁻¹, enquanto as representantes do estado de Minas Gerais, a menor concentração da enzima, 42,80 UI mg⁻¹. Em função do número restrito de exemplares, estudos adicionais devem ser realizados para uma melhor elucidação e correlação desses dados com a origem das amostras. Para a classificação botânica, os resultados foram bem significativos para os méis de Laranjeira Teresópolis e Juiz de Fora, próximos a 68 UI mg⁻¹, e Assa-Peixe Teresópolis (classificado como mel silvestre nas análises palinológica, capítulo 3), Silvestre Teresópolis e Viçosa, próximos a 67 UI mg⁻¹. O mel de Assa-Peixe Juiz de Fora, classificado com *Eucalyptus sp.* e Eucalipto Juiz de Fora apresentaram valores médios de catalase em 65 UI mg⁻¹. E por fim, o mel de Eucalipto Teresópolis não pode ser agrupado neste último, visto que seu teor de catalase ficou bem aquém dos anteriores (9,97 UI mg⁻¹).

6.5. COMPARAÇÃO DOS TEORES DE H₂O₂ E DE CATALASE NAS AMOSTRAS DE MEL

A figura 87 mostra a distribuição dos teores catalase (UI mg⁻¹) das 17 amostras em torno da média. Fica evidente que a maioria dos exemplares apresentou-se com teores elevados e/ou em torno da média aritmética dos cálculos e apenas algumas amostras obtiveram níveis baixos de catalase (Eucalipto Teresópolis, Laranjeira Japão, Rengue e Morrão de Candeia). Tais informações serão essenciais para um comparativo entre os teores de catalase e H₂O₂.

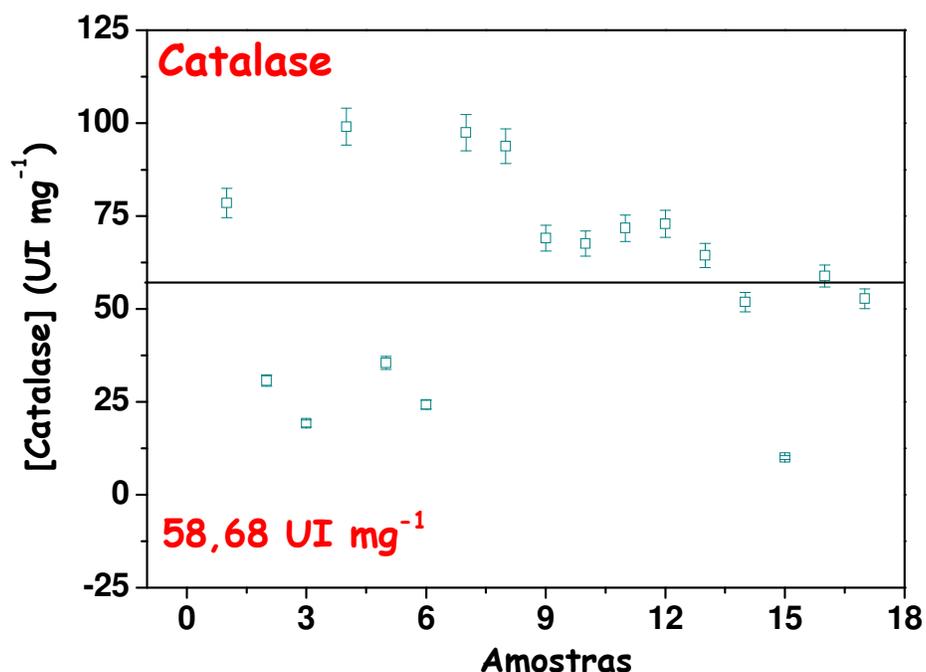


Figura 87: Distribuição dos teores de catalase (UI mg⁻¹) em torno do valor médio para a determinação amperométrica diferencial.

Na introdução (capítulo 1) deste trabalho foi relatado que os níveis de catalase controlariam os teores de H₂O₂ no mel, fato este que poderia influenciar na capacidade antimicrobiana, anti-séptica e nas propriedades terapêuticas cicatrizantes das amostras. A pesquisa não apenas se preocupou em desenvolver uma metodologia para quantificar, de forma inédita, os níveis de H₂O₂ e catalase, mas também procurou

correlacionar tais valores, a fim de estabelecer uma ligação entre eles e a real influência nas propriedades citadas (tabela 15).

Tabela 15: Correlação entre origem geográfica e botânica, os níveis de H₂O₂ (determinação espectrofotométrica e amperométrica) e catalase em 17 amostras comerciais de mel.

Amostra	Origem Botânica / Geográfica	Catalase (UI mg ⁻¹)	H ₂ O ₂ (µg g ⁻¹)	H ₂ O ₂ (µg g ⁻¹)
		Amperometria	Espectrofotometria	Amperometria
1	Manuka +5 / Nova Zelândia	78,51 ± 1,50	123,50 ± 2,30	98,20 ± 2,00
2	Laranjeira / Japão	30,73 ± 2,02	32,60 ± 1,95	40,50 ± 2,05
3	Rengue / Japão	19,16 ± 1,09	94,08 ± 1,88	93,91 ± 0,22
4	Cassutinga / F.Santana (BA)	99,07 ± 2,16	47,68 ± 1,53	47,61 ± 0,45
5	Velame / Sta Bárbara (MG)	35,50 ± 2,08	20,46 ± 1,97	20,33 ± 0,28
6	Morrão de Candeia / Teresópolis (RJ)	24,26 ± 1,00	123,89 ± 6,01	131,00 ± 1,45
7	Bracatinga / Teresópolis (RJ)	97,44 ± 1,02	64,98 ± 3,36	8,12 ± 0,59
8	Cipó-Uva / Teresópolis (RJ)	93,80 ± 1,45	51,80 ± 1,29	8,57 ± 0,24
9	Laranjeira / Teresópolis (RJ)	69,04 ± 0,99	4,22 ± 0,26	4,32 ± 0,33
10	Laranjeira / Juiz de Fora (MG)	67,55 ± 1,30	39,78 ± 1,58	28,09 ± 1,48
11	Assa Peixe / Teresópolis (RJ)	71,73 ± 0,55	70,66 ± 6,01	71,18 ± 6,10
12	Assa Peixe / Juiz de Fora (MG)	72,91 ± 1,32	90,52 ± 3,50	46,75 ± 0,85
13	Silvestre / Teresópolis (RJ)	64,43 ± 0,39	120,44 ± 4,79	142,01 ± 4,44
14	Silvestre / Viçosa (MG)	51,86 ± 2,99	150,88 ± 3,45	155,04 ± 2,45
15	Eucalipto / Teresópolis (RJ)	9,97 ± 0,08	206,15 ± 4,02	214,32 ± 4,23
16	Eucalipto / Juiz de Fora (MG)	58,89 ± 0,02	85,54 ± 3,10	91,46 ± 3,57
17	Mel Abelha Jataí / Campinas (SP)	52,76 ± 0,05	199,67 ± 6,65	160,00 ± 3,65
Média	-	58,68	89,86	80,08
V max	-	99,07	206,15	214,32
V min	-	9,97	4,22	4,32

Pela tabela acima, alguns valores podem ser agrupados de forma significativa, como o menor teor de catalase e o maior de H₂O₂ para a amostra Eucalipto Teresópolis. Laranjeira Teresópolis, Cipó-Uva, Cassutinga e Bracatinga obtiveram valores baixos de peróxido, nas duas técnicas utilizadas, em contrapartida, os níveis de catalase se mostraram acima da média e elevados. A análise comparativa (tabela 12) da catalase de todas as 17 amostras de mel revelou uma correlação negativa grau REGULAR ou MODERADO aos teores de H₂O₂ obtidos pelas determinações espectrofotométricas e amperométricas, com coeficiente de correlação de Pearson, encontrados em -0,37646 e -0,54979, respectivamente (figura 88). Entretanto se descartássemos três das amostras pesquisadas: Laranjeira Japão, Rengue e Velame, a correlação negativa entre catalase e H₂O₂ subiria para o grau FORTE, indicando que a

enzima realmente pode influenciar nos teores de H_2O_2 . Os coeficientes de Pearson encontrados foram -0,68621 e -0,79979, para as medidas espectrofotométricas e amperométricas (figura 89), respectivamente.

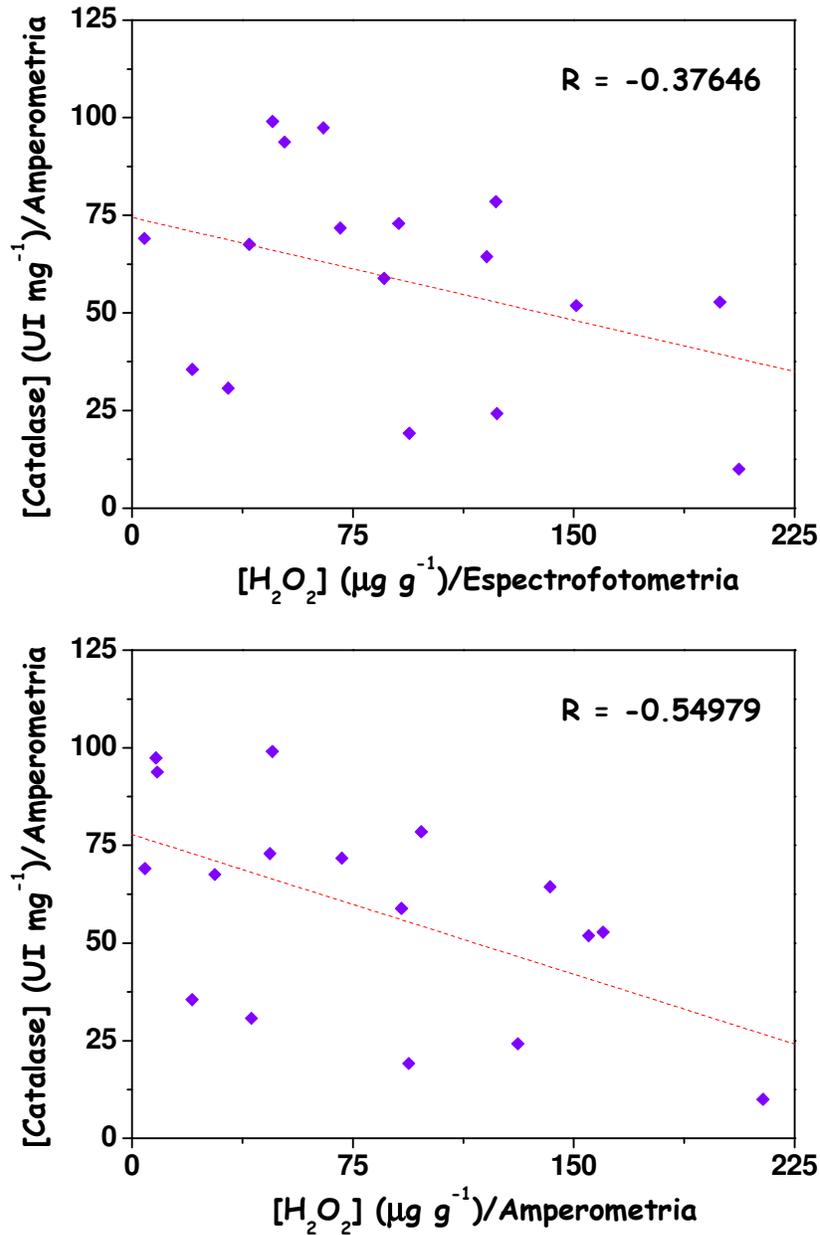


Figura 88: Comparação entre os resultados obtidos para os teores de catalase e H_2O_2 quantificados pela metodologia espectrofotométrica e amperométrica para as 17 amostras de mel.

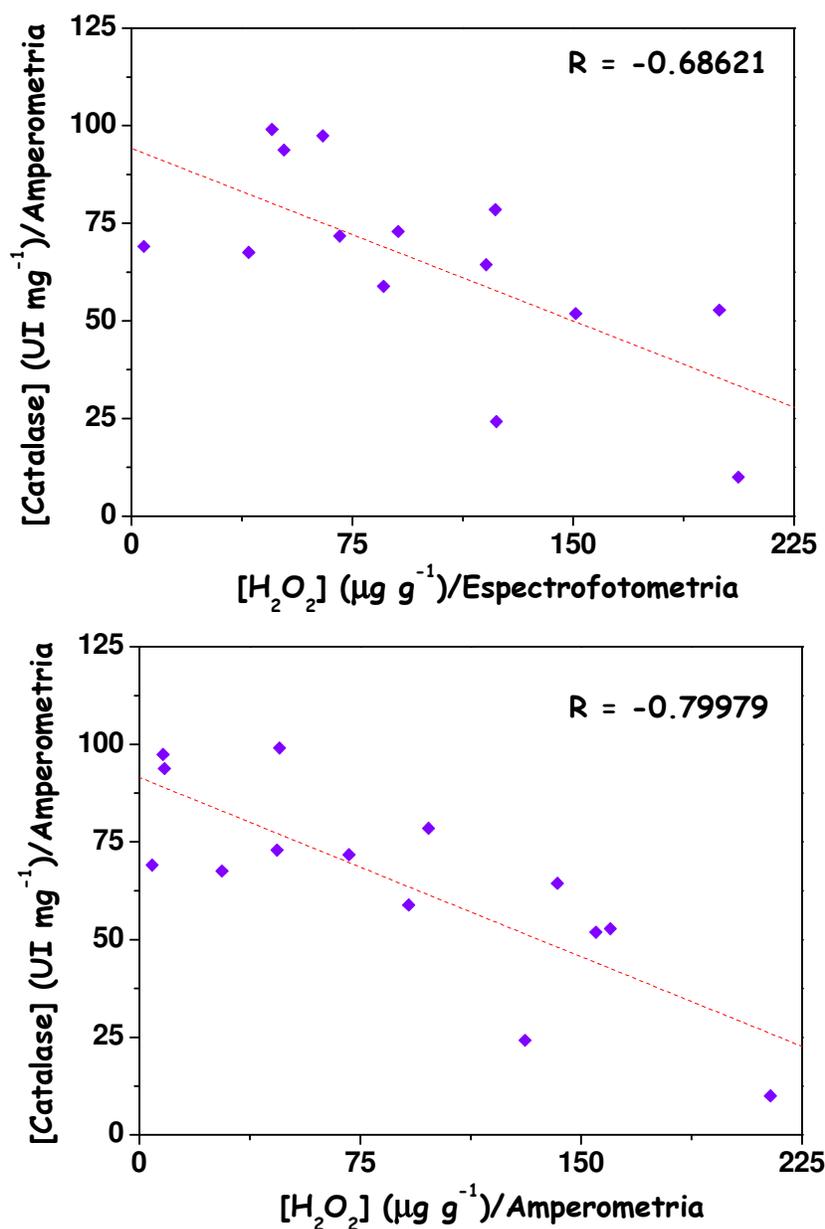


Figura 89: Comparação entre os resultados obtidos para os teores de catalase e H₂O₂ quantificados pela metodologia espectrofotométrica e amperométrica para 14 amostras de mel (excluíram-se os exemplares; Laranjeira Japão, Rengue e Velame, para esta correlação).

Não se pode descartar a influência da catalase nos níveis de H₂O₂, nas amostras de mel, porém outros fatores podem alterar estes teores, como a presença de metais e algumas vitaminas (e.g. ácido ascórbico), açúcares (especialmente a glicose), a glicose oxidase, além da forma e o tempo de estocagem das amostras.

Por fim, outro aspecto avaliado na pesquisa e de grande interesse para a comunidade científica é relacionar o teor de alguns componentes das amostras de mel e caracterizá-los com sua origem geográfica e botânica, analisando como a influência humana, possíveis condições ambientais e botânicas que possam atingir as amostras durante o processo de colheita realizado pelas abelhas. Na determinação geográfica, para os teores quantificados de H_2O_2 e catalase, brevemente descrito nos itens anteriores, dividiram-se as amostras em 4 origens: Teresópolis (RJ), Minas Gerais, estrangeiras e outras. Os gráficos tipo *Box and Whiskers* (figura 90) classificaram o teor desses analitos de acordo com sua origem geográfica, mostrando pontos como os valores mínimo e máximo, mediana, média aritmética, 1º, 25º, 75º e 99º percentis.

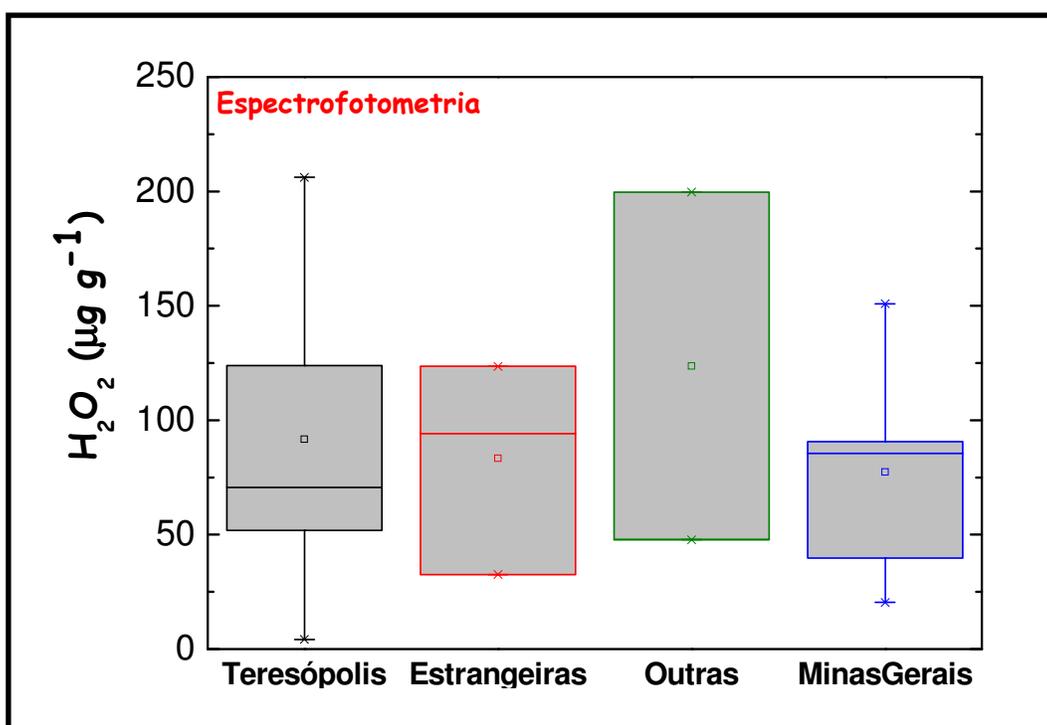


Figura 90: *Box and Whiskers* dos teores de H_2O_2 (espectrofotometria e amperometria) e catalase analisados na pesquisa e sua classificação geográfica (intervalo de confiança 95%).

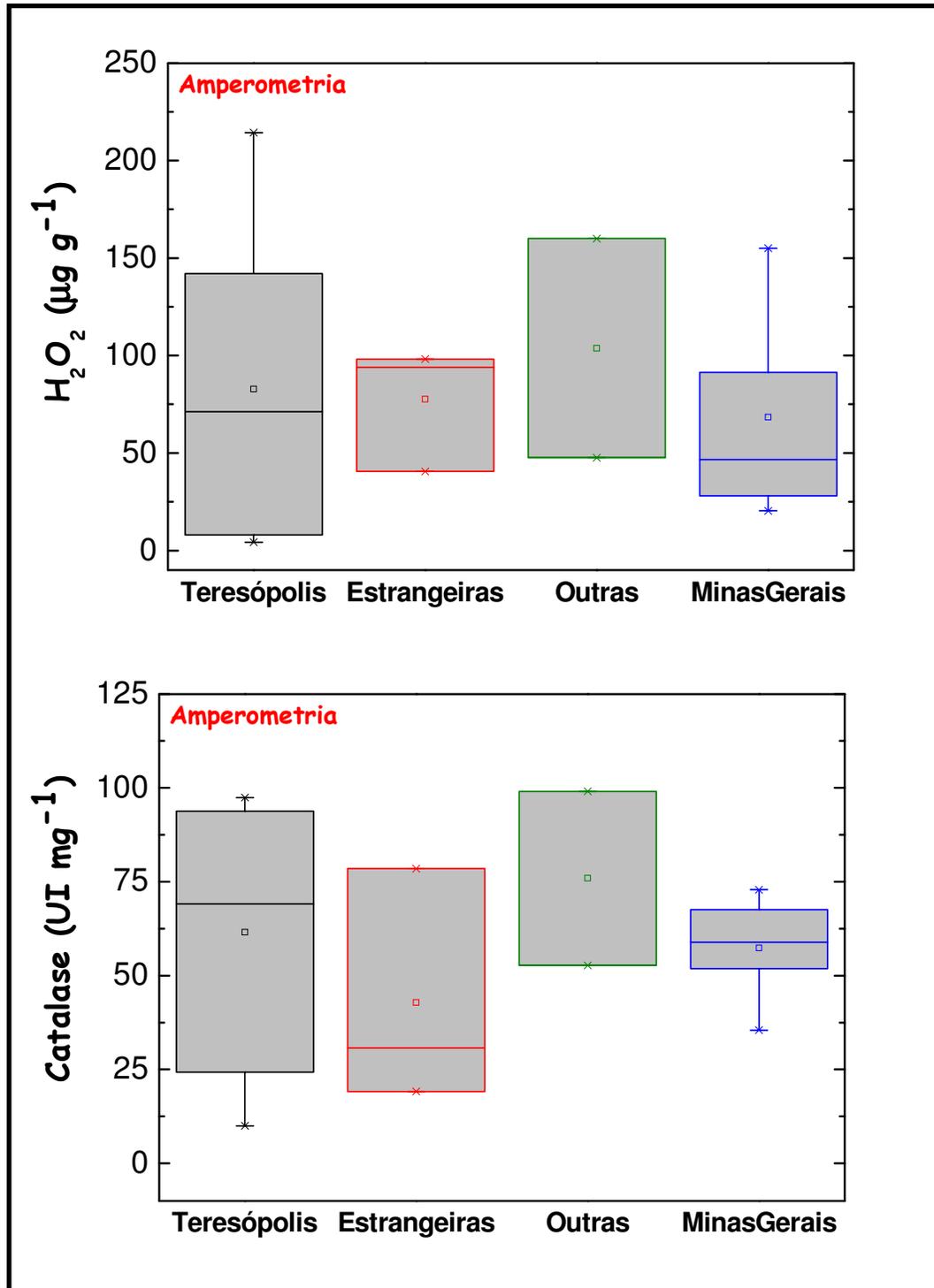


Figura 90: continuação.

**7. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
DAS AMOSTRAS DE MEL**

7.1. INTRODUÇÃO

A ação antimicrobiana é reconhecidamente a mais importante atribuição terapêutica relacionada ao mel, abrangendo um largo espectro de bactérias patogênicas Gram negativas e positivas, descritas tanto com atividade bacteriostática e bactericida, sem deixar de destacar o poder antifúngico também. Esta notável característica inerente à complexidade de sua matriz é que desafia os cientistas a elucidar o real componente ou a conjuntura de fatores que possam explicar tais propriedades. As pesquisas revelam de forma pragmática que os principais fatores antimicrobianos se dividem em 2 grupos: o *não-peróxido* (osmolaridade, acidez, compostos fitoquímicos e catalase) e o outro ligado à presença do peróxido de hidrogênio. [50, 52-54, 63-70]

As metodologias descritas para a avaliação de tais propriedades e a forma de trabalho/manipulação das amostras são as mais variadas possíveis o que justifica a gama de publicações em diversos segmentos da comunidade científica. Em alguns estudos cujo objetivo é justificar a atividade antimicrobiana a uns dos componentes do chamado fator *não-peróxido*, normalmente as amostras passam por processos de pré-tratamento e remoção do H_2O_2 pela catalase. Para separar estes componentes, conhecidos como compostos fitoquímicos, muitas vezes, submetem-se as amostras a um fracionamento com auxílio de colunas cromatográficas (HPLC e GC) ou extração em fase sólida. Por outro lado, em alguns casos, a remoção de componentes voláteis e ácidos orgânicos ocorre por destilação ou rotaevaporação com o controle da acidez/basicidade das matrizes [64, 67, 69, 87, 90, 99, 130].

Os teores das amostras utilizadas podem variar de 0 a 100% para a busca da concentração inibitória mínima de crescimento de uma linhagem bacteriana. Como a osmolaridade influencia no poder antimicrobiano, muitas vezes controles utilizando soluções saturadas de açúcares (e.g. glicose e frutose) são utilizados. Em alguns testes de difusão em ágar a avaliação é feita em comparação paralela a soluções de fenol (m/v), verificando os equivalentes desses padrões, em termos de concentração, para a expressão da atividade antibacteriana das amostras. Esse tipo de ensaio é uma

alternativa aos testes cujos os resultados não contemplam o efeito osmótico do mel [69, 83, 88, 92, 94, 99].

Garedew, Schmolz e Lamprecht (2004) [98] propuseram o ensaio antimicrobiano por microcalorimetria. Uma técnica adicional e robusta que minimiza algumas possíveis desvantagens das metodologias usuais como: problemas no tamanho do inóculo, consistência do ágar, temperatura de incubação inadequada e baixa credibilidade quando o teste é realizado com substâncias de baixa polaridade [98]. De forma similar, Patton et al. (2006) [105] demonstraram que os ensaios microbiológicos espectrofotométricos, em comparação aos testes de difusão, apresentaram melhorias significativas na precisão, sensibilidade, eficiência com automação, rapidez e simplicidade durante a análise, sendo mais uma alternativa às metodologias tradicionais de avaliação do poder antimicrobiano no mel, inclusive para baixas concentrações das amostras [105].

Apesar da diversidade de metodologias, os testes padrões seguem as normas recomendadas pela CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), antigo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), uma organização internacional multidisciplinar, sem fins lucrativos, que desenvolve normas e diretrizes para experimentos de patologia clínica. Seu reconhecimento baseia-se no princípio de que o consenso é a maneira mais efetiva e custo-eficaz de melhorar os ensaios clínicos e serviços relacionados de atenção à saúde. Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo responsável por um processo infeccioso que exija terapia antimicrobiana, quando é impossível prever a sensibilidade desse organismo, mesmo conhecendo a sua identificação. Diversos métodos laboratoriais podem ser utilizados para medir a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos. Em muitos laboratórios de microbiologia, utiliza-se rotineiramente o método de disco-difusão em ágar para testar os patógenos mais comuns, de crescimento rápido e determinadas bactérias fastidiosas.

A orientação fornecida pelo teste sobre a eficácia de um determinado agente antibacteriano contra uma espécie causadora de infecção pode vir a ser de grande importância, visto que diferentes espécies bacterianas, ou diferentes cepas de uma mesma espécie, podem demonstrar diferentes níveis de sensibilidade deste agente. O

papel da CLSI, portanto, fundamenta-se em descrever uma série de procedimentos para padronizar a execução dos testes de disco-difusão, além das etapas do desempenho, aplicações e limitações dos métodos atualmente recomendados. Uma vez determinada, de forma qualitativa, a sensibilidade do microrganismo frente ao agente testado, rotineiramente passa-se para a segunda etapa da avaliação antimicrobiana, isto é, os testes de padrão de diluição em caldo (macrodiluição e microdiluição) e diluição em ágar. Estes medem quantitativamente a atividade *in vitro* da linhagem bacteriana contra o agente antimicrobiano estudado e expressam os resultados em termos de concentração inibitória mínima (CIM), isto é, a quantidade (concentração ou teor) mínima (o) do agente necessária (o) para impedir o crescimento (ação bacteriostática) ou matar (ação bactericida) a bactéria. [170-172]

A ATCC[®] ou *American Type Culture Collection (The Global Bioresource Center™)* é um centro não lucrativo de fonte e conhecimento que fornece produtos biológicos, serviços técnicos e programas educacionais às indústrias, aos governos e às organizações acadêmicas em torno do mundo. Ela tem a missão de adquirir, autenticar, preservar, desenvolver e distribuir materiais biológicos. Também promove o desenvolvimento da informação, tecnologia, os padrões para o avanço, validação e a aplicação do conhecimento científico, nas mais diversas áreas de atuação (projeto genoma, biomarcadores de doenças, imunologia e a bio-informática). Uma das vertentes de trabalho da ATCC[®] é a pesquisa microbiológica, no âmbito do fornecimento de culturas bacterianas padrões aos órgãos de pesquisa oficiais em todo o mundo, como CLSI para que as mesmas validem suas mais diversas metodologias e análises microbiológicas [173]. É a partir de cepas padrões ATCC[®] que todas as pesquisas antimicrobianas realizadas com o mel são realizadas.

As pesquisas microbiológicas com o mel envolvem dois tipos de investigação: os testes *in vivo* e *in vitro*. No primeiro caso, eles são feitos a partir da inoculação de bactérias patogênicas em cobaias, como camundongos, com a posterior avaliação da capacidade da inibição do crescimento e interrupção da infecção, onde o mel simula a ação de um antibiótico, semelhante ao desenvolvido nos testes pré-clínicos para avaliação do potencial terapêutico de uma droga [86, 96]. O segundo exemplo pode ser realizado a partir de achados bacterianos comuns em infecções de feridas, úlceras

epiteliais e conjuntivas, queimaduras, processos invasivos cirúrgicos como catéteres, sondas, implantes, enxertos e biofilmes ou de linhagens padrões ATCC[®]. Microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, sem contar bactérias multi-resistentes, insensíveis aos antibióticos de primeira escolha. Os exemplos mais comuns são as cepas Gram positivas de *Staphylococcus aureus* meticilina (MRSA) e oxacilina (ORSA) resistentes e *Enterococcus spp.* vancomicina resistente (VRE). As Gram-negativas, como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*, são resistentes aos aminoglicosídeos [83, 95, 96, 103, 106, 108, 114-122]. Basicamente, os testes *in vitro*, seguem dois protocolos de pesquisa preconizados pela CLSI: difusão em ágar e diluição em caldo. Como descrito, um avalia a sensibilidade ou resistência de determinadas concentrações de mel (m/v) frente às cepas de bactérias e o outro quantifica o teor mínimo necessário da amostra para inibir o crescimento ou matar a bactéria. [68, 82, 87, 89-92, 100-102, 104, 107, 110-113].

O *E-test*[®] (*Epsilometer test*) também é uma alternativa é baseada na combinação dos conceitos de testes de diluição e difusão e amplamente utilizado nos Estados Unidos e Europa. Como os métodos de CIM, o *E-test*[®] quantifica diretamente a sensibilidade antimicrobiana. Mesmo sendo processado como teste de difusão em disco, o *E-test* difere do método disco convencional pelo uso de um gradiente pré-formado e estável de antimicrobiano. O *E-test*[®] consiste numa fita plástica fina, inerte e não porosa de 5 mm largura e 50 mm de comprimento. Um lado da fita é marcado com uma escala de leitura de CIM em $\mu\text{g mL}^{-1}$. Um código de letras designa a identidade do antibiótico. Um gradiente exponencial pré-definido do antibiótico seco e estabilizado é mobilizado no outro lado da fita, com uma concentração máxima e mínima nas extremidades da fita. O gradiente reflete uma faixa contínua de concentração que varia dependendo do antibiótico usado. Esta faixa corresponde a várias diluições num método convencional de CIM. Quando uma fita de *E-test*[®] é aplicada numa placa de ágar inoculado, há uma liberação imediata do antibiótico o meio de cultura. Após incubação, normalmente em 24 horas ou em *overnight*, quando o crescimento bacteriano se torna visível, uma elipse de inibição simétrica ao redor da fita é

visualizada, onde esta se encontra num ponto específico da fita indicando a CIM (figura 91). É uma técnica quantitativa para determinação de sensibilidade antimicrobiana tanto de bactérias aeróbias não fastidiosas Gram negativas e Gram positivas (e.g. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Enterococcus*) como bactérias fastidiosas como bactérias anaeróbias estritas, *N. gonorrhoeae*, *S.pneumoniae*, *Streptococcus* e *Haemophilus*. [174-176]



Figura 91: *E-test*[®] (*Epsilon*meter test).
Fonte: Wikipedia (2010) [176].

É neste contexto que as investigações microbiológicas com o mel se destacam especialmente com o intuito de elucidar seu real potencial antimicrobiano terapêutico e correlacioná-lo com a complexidade química de sua matriz.

7.2. MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1. Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico. Cloreto de bário dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) foi obtido da Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda – Duque de Caxias (RJ), ácido sulfúrico (95-98%) e cloreto de

sódio (NaCl) da Vetec[®] Química Fina Ltda – Duque de Caxias (RJ) foram usados para o ajuste da escala McFarland e diluições das cepas bacterianas, respectivamente. Água desionizada Milli-Q (resistividade maior que 18 MΩ cm) também foi utilizada para a diluição e preparo de soluções. Tampões Merck[®] pH 4,01 e 7,00, além de solução eletrolítica de KCl à 3,0 mol L⁻¹ da WTW D-82362 Weilheim, Germany foram usadas para a calibração e condicionamento do pHmetro, respectivamente. Tubos de ensaio 13 x 100 mm, alças com swabs e placas de Petri descartáveis Dispopetri[®] estéreis 90 x 15 mm foram adquiridas da SOS Laboratório, Belo Horizonte (MG) para os testes de difusão em ágar e diluição em caldo. Meios de cultura Ágar Mueller Hinton, Ágar Soja e Caldo Mueller Hinton da Himedia Laboratories, Mumbai, Índia foram utilizadas para o crescimento e inoculação bacteriana.

7.2.2. Coleções de Bactérias

As linhagens bacterianas utilizadas seguiram os padrões ATCC[®] ou CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) e foram adquiridas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Laboratório de Microrganismos de Referência, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro (RJ). Dezoito exemplares foram escolhidos para os experimentos:

- *Staphylococcus epidermidis* ATCC[®] 12228
- *Micrococcus lentus* ATCC[®] 10240
- *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25923
- *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 33591
- *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213
- *Enterococcus faecalis* ATCC[®] 51299
- *Shigella sonnei* ATCC[®] 25931
- *Enterobacter cloacae* ATCC[®] 13047
- *Citrobacter freundii* ATCC[®] 8090

- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 13866
- *Enterobacter aerogenes* CDC 1680
- *Salmonella typhi* ATCC® 19430
- *Escherichia coli* ATCC® 11229
- *Proteus mirabilis* CDC 305
- *Providencia stuartii* ATCC® 29914
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853
- *Escherichia coli* ATCC® 35218
- *Serratia marscescens* ATCC® 4133

As bactérias do gênero *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Enterococcus* foram as representantes Gram positivas do ensaio, enquanto *Shigella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas* e *Serratia* completaram a coleção como os exemplares Gram negativos.

7.2.3. Instrumentação

Um espectrofotômetro duplo feixe (U.V. 1601 PC) Shimadzu®, com cubetas de vidro e quartzo (caminho óptico 1,00 cm), foi usado para registrar o grau de turbidez e espectro de absorção da solução de BaSO₄. Estufa incubadora e para cultura bacteriológica SX 1.2 DTMC - Sterilifer, além de uma Autoclave Vertical Linha AV Mod. AV-100 Phoenix, para esterilizar meios e vidrarias através do calor úmido sob pressão, completaram a lista de instrumentos utilizados para a realização das análises *in vitro*.

7.2.4. Metodologia: Teste de Difusão em Ágar e de Diluição em Caldo

Teste de Difusão em Ágar:

O meio de cultura ágar Mueller Hinton (MHA), padronizado por Kirby e Bauer e pela CLSI / NCCLS, é o que oferece melhores condições de crescimento para as principais bactérias, satisfazendo exigências e sendo recomendado por diversos autores para os experimentos. Ele é utilizado para a realização do teste de avaliação da resistência aos antimicrobianos pelos métodos de difusão em disco, além do *E-test*[®] para enterobactérias, bactérias não-fermentadoras e espécies dos gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus*. As características necessárias ao meio de cultura devem sustentar o bom crescimento dos organismos onde substâncias não podem antagonizar a atividade do mel avaliado e mudanças de pH durante o período de incubação devem ser evitadas a fim de não comprometer os resultados finais. A faixa ideal de pH deve manter-se entre 7,2 e 7,4. Quando usado para o teste de difusão, o meio deve ser adicionado às placas em quantidade suficiente para que solidifique com uma espessura de 4 mm. As placas podem ser mantidas sob refrigeração (4 °C) por até 3 meses, devendo, no momento do uso, serem recuperadas a temperatura ambiente. [177-181]

Para a realização dos testes, o procedimento de preparo e hidratação do meio foi feito conforme instruções do fabricante (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia). Após retirar o produto da autoclave cerca de 50 mL do meio foram distribuídos em placas de Petri com 150 mm de diâmetro. O resfriamento foi feito em temperatura ambiente e os meios foram acondicionados em geladeira a uma temperatura de 4°C.

Na produção de um inóculo bacteriano contendo, $1,5 \times 10^8$ microrganismos mL⁻¹ foram preparados correspondentes à escala 0,5 McFarland em solução salina estéril (NaCl 0,9% m/v). A escala foi feita misturando padrões de H₂SO₄ a 1,0% (m/v) e BaCl₂ a 1,175% (m/v), nas seguintes proporções conforme descrito na tabela 16. Em 10 tubos de ensaio (13 x 100 mm), lentamente e sob constante agitação, as soluções foram preparadas e fechadas hermeticamente, conservando-as à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O precipitado de sulfato de bário (BaSO₄), quando ressuspenso,

corresponde à densidade conferida por cultivo de *Escherichia coli* em meio líquido, nas concentrações relacionadas na tabela abaixo:

Tabela 16: Valores da escala de Mc Farland, em relação ao número e a composição do tubo e sua correspondência em número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC mL⁻¹).

Soluções	Escala Mc Farland										
	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BaCl₂ (1,175% m/v)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
H₂SO₄ (1,0% m/v)	9,95	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0
Concentração (x 10⁸ UFC mL⁻¹)	1,5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

Fonte: Bier (1990) [182].

A densidade correta do controle de turbidez foi verificada usando um espectrofotômetro com fonte de luz e cubetas de 1 cm (caminho óptico) apropriadas para determinar a absorbância. A absorbância em 625 nm variou entre 0,08 e 0,10 para a solução padrão McFarland de 0,5 [172] e a cor original do meio apresentou-se semelhante à amarela palha.

O *screening* do potencial antimicrobiano das 17 amostras de mel contra linhagens de bactérias para o teste de difusão em ágar usado neste trabalho foi semelhante ao descrito por Alviano et al. (2008) [183] e Almeida et al. (2009) [184] junto à norma M100-S17 aprovada pela CLSI/NCCLS (2007) [170]. O halo de inibição foi particular para cada amostra testada e seus diâmetros determinaram, para cada microrganismo, a leitura qualitativa e foram fundamentais para a escolha das amostras de mel a serem utilizadas nos testes de diluição em caldo.

Para o crescimento das colônias, incubaram-se aerobicamente por 24h a 37°C as células bacterianas em ágar triptcaseína soja ou ágar soja (TSA). O inóculo foi obtido de formas variadas selecionando 4 ou 5 colônias desenvolvidas em meio sólido e que apresentaram o mesmo tipo morfológico. Transferiram-se estas colônias para o meio líquido. Ajustou-se a turvação com solução salina estéril até a concentração desejada. Após ajustar a escala a turbidez na escala 0,5 Mc Farland (1,5 x 10⁸ UFC mL⁻¹) os inóculos foram diluídos 1:100 para a obtenção de 1,5 x 10⁶ UFC mL⁻¹ de bactérias.

Antes da semeadura retirou-se o excesso de inóculo pressionando o swab contra as paredes internas do tubo que contém a suspensão de bactérias.

Para a prova de difusão, 1 mL do inóculo foi semeado, de forma uniforme e homogênea, na superfície do meio sólido (MHA) fazendo-se uso de um swab impregnado na suspensão bacteriana. As placas foram mantidas a temperatura ambiente até que todo o excesso de umidade tenha sido absorvido pelo meio e após 10 minutos, 50 μL de cada mel foram colocados em orifícios de 5 mm produzidos na superfície do ágar. Todas as placas foram incubadas aerobicamente a 35,5 $^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e os halos de inibição foram avaliados (figura 92). Para cada amostra os testes realizaram-se em triplicata. Cabe lembrar que períodos mais prolongados foram ser evitados, pois poderiam afetar a reprodutibilidade dos resultados, uma vez que as provas de difusão em ágar do teste são aplicadas apenas para organismos de crescimento rápido. Bactérias com crescimento lento e/ou anaeróbios não foram testadas por esse método.

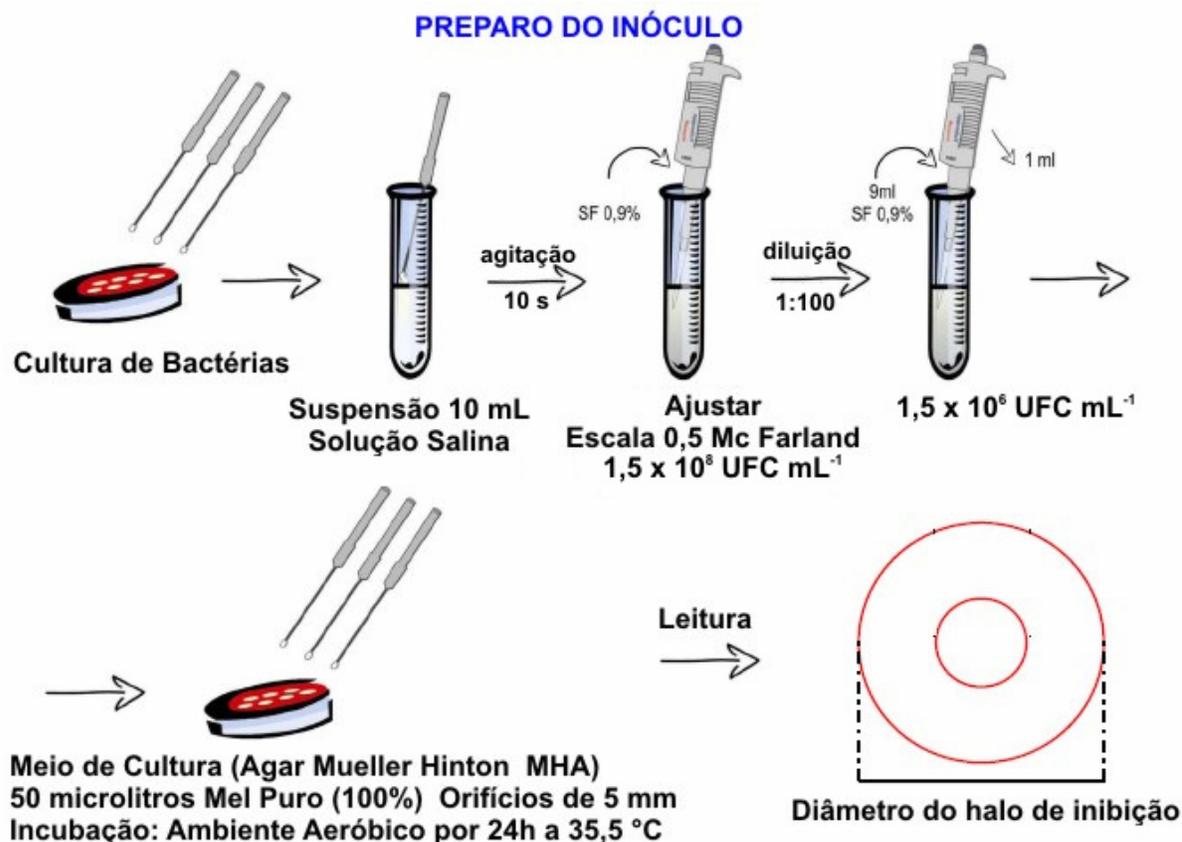


Figura 92: Esquema de preparo do inóculo e semeadura das bactérias em meio aeróbico a 35,5 $^{\circ}\text{C}$ por 24 h em ágar Mueller Hinton (MHA).

Fonte: adaptado de Batista (2006) [185].

Teste de Diluição em Caldo:

Os métodos de diluição em caldo ou ágar são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano. Recomenda-se o Caldo de Mueller Hinton (MHB) como meio de primeira escolha para os testes de sensibilidade de organismos facultativos ou organismos aeróbios de crescimento rápido mais comumente isolados. O MHB apresenta uma boa reprodutibilidade entre lotes nos testes de sensibilidade e produz crescimento satisfatório da maioria dos patógenos. Além disso, há um grande acervo de dados e experiências sobre testes realizados com esse meio, podendo ser suplementado para suportar o crescimento de bactérias fastidiosas. A realização dos testes de CIM e as características químicas do caldo de Mueller-Hinton devem ser monitoradas de maneira rotineira, onde o pH de cada lote de caldo deve ser ajustado em 7,2 – 7,4 a temperatura ambiente. [172]

A avaliação da CIM foi determinada com base no método de diluição em caldo de acordo com as recomendações M7-A6 da CLSI/NCCLS (2003) [172] descrito por Alviano et al. (2008) [183] e Almeida et al. (2009) [184].

Para a realização do teste de macrodiluição em caldo utilizaram-se tubos de ensaio esterilizados e um tubo de controle contendo caldo sem o mel (preparado com solução salina), os quais foram fechados com tampas de rosca ligeiramente soltas. Concentrações das amostras, variando entre 2 e 30% (v/v) foram preparadas em triplicata e adicionadas ao MHB com a obtenção de um volume final de 2 mL. Os inóculos de cada linhagem bacteriana foram ajustados com a turbidez semelhante a escala 0,5 Mc Farland e diluídos 1:100 para obtenção de $1,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Desta diluição 2 µL foi adicionada aos tubos teste contendo 2 mL de MHB e as diluições das amostras de mel nas várias concentrações anteriormente citadas, obtendo uma concentração final das linhagens bacterianas de $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ (figura 93). Os tubos foram incubados aerobicamente por 18 h a 35,5°C. A CIM foi a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo nos tubos conforme detectado a olho nu pela transparência dos mesmos. A quantidade de crescimento nos tubos contendo o mel foi comparada com a quantidade

de crescimento nos tubos de controle de crescimento (sem o mel) usada em cada conjunto de testes ao determinar os pontos finais de crescimento.

A fim de garantir e avaliar as concentrações bactericidas, 0,1 mL de cada diluição após 24h de crescimento foi semeada em placas contendo ágar soja (TSA), onde nova incubação se realizou por 24h a 37 °C. A concentração bactericida de cada mel, para cada espécie de bactéria foi aquela considerada a menor concentração das amostras que inibe 100% do crescimento bacteriano (figura 93).

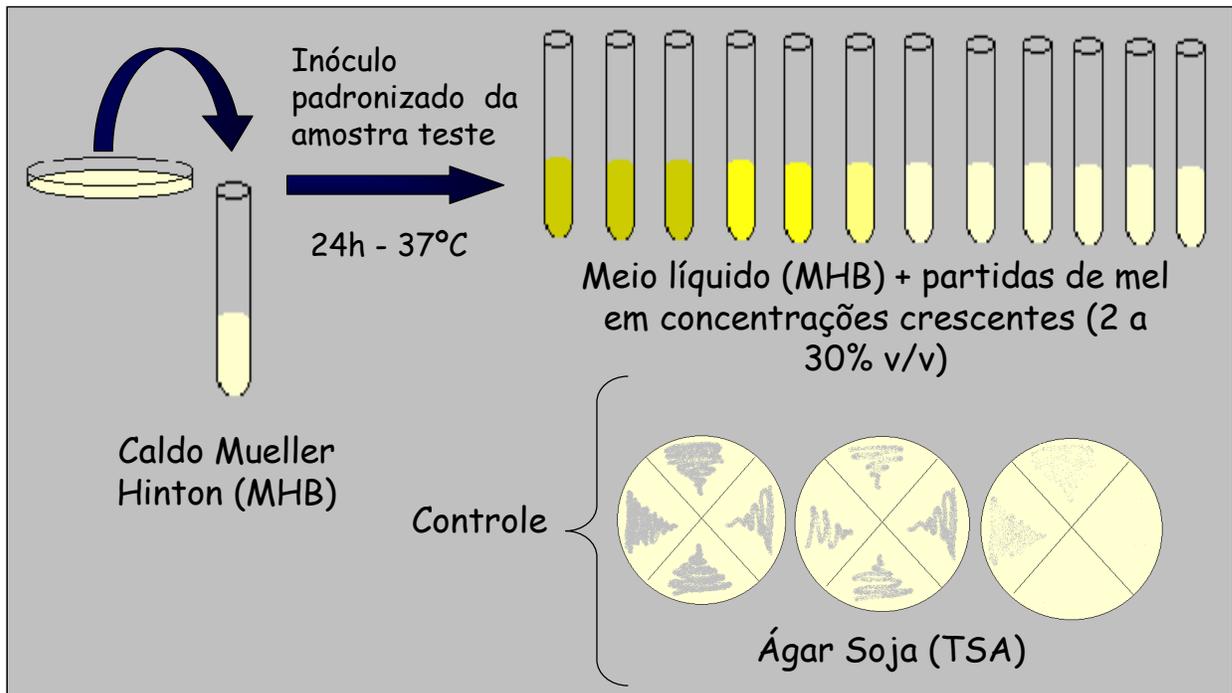


Figura 93: Esquema do preparo do inóculo para os testes de macrodiluição em caldo e avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) bacteriostática ou bactericida para as amostras de mel estudadas.

7.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A atividade antibacteriana *in vitro* para o teste de difusão em ágar das 17 amostras de mel na concentração de 100%, está destacada na tabela 17. As amostras 1 (Manuka +5), 2 (Laranjeira Japão), 3 (Rengue), 4 (Cassutinga) apresentaram significativa atividade antibacteriana contra as espécies *Staphylococcus epidermidis* ATCC[®] 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 33591, *Salmonella tify* ATCC[®] 19430, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®] 27853, *Escherichia coli* ATCC[®] 35218 e *Serratia marscesces* ATCC[®] 4133. *Proteus mirabilis* CDC[®] 305 foi sensível aos exemplares 2 (Laranjeira Japão), 4 (Cassutinga), 5 (Velame), 6 (Morrão de Candeia), 7 (Bracatinga), 10 (Laranjeira Juiz de Fora), 11 (Assa-Peixe Teresópolis), 12 (Assa-Peixe Juiz de Fora), 13 (Silvestre Teresópolis), 14 (Silvestre Viçosa) e 16 (Eucalipto Juiz de Fora). O mel 12 (Assa-Peixe Juiz de Fora) exibiu poder antimicrobiano contra as linhagens de *Staphylococcus epidermidis* ATCC[®] 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC[®] 51299, *Escherichia coli* ATCC[®] 11229 e *Serratia marscesces* ATCC[®] 4133, bem como a amostra 16 (Eucalipto Juiz de Fora) contra *Staphylococcus epidermidis* ATCC[®] 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25923, 33591 e 29213, *Escherichia coli* ATCC[®] 11229, *Providencia stuartii* ATCC[®] 29914 e *Serratia marscesces* ATCC[®] 4133.

Micrococcus lentus ATCC[®] 10240, *Enterobacter cloacae* ATCC[®] 13047, *Citrobacter freundii* ATCC[®] 8090, *Klebsiella pneumoniae* ATCC[®] 13866 e *Enterobacter aerogenes* CDC[®] 1680 demonstraram resistência a todos os exemplares de mel selecionados para pesquisa.

Entre as amostras investigadas, 7 foram selecionadas para os ensaios de diluição em caldo: 1 (Manuka +5), 2 (Laranjeira Japão), 3 (Rengue), 4 (Cassutinga), 12 (Assa-Peixe Juiz de Fora), 15 (Eucalipto Teresópolis) e 16 (Eucalipto Juiz de Fora). Apesar do mel Eucalipto Teresópolis ter demonstrado pouca atividade antibacteriana no teste de difusão em ágar, sua escolha foi em função dos elevados teores de H₂O₂ e baixos de catalase verificados nos capítulos 4 ao 6. Sete linhagens de bactérias também foram selecionadas: 3 Gram + (*Staphylococcus epidermidis* ATCC[®] 12228,

Staphylococcus aureus ATCC® 25923 e 29213) e 4 Gram – (*Salmonella tify* ATCC® 19430, *Escherichia coli* ATCC® 11229 e 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853) por terem apresentado maior sensibilidade aos méis estudados e apresentarem grande incidência em infecções epidérmicas e gastrointestinais. O objetivo dos experimentos foi determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a consequente avaliação da atividade bactericida ou bacteriostática.

Tabela 17: Atividade antibacteriana *in vitro* das 17 amostras de mel (100%) e o diâmetro (mm) dos halos de inibição.

Bactérias	ATCC® / CDC	Amostra de Mel (n°)																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
		Halos (mm)																
Gram (+) <i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	14	14	10	12	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	14	nr
<i>Micrococcus lentus</i>	10240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	18	14	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	
<i>Staphylococcus aureus</i>	33591	14	10	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	1	1	1	-	10	-	2	-	-	-	2	12	2	12	2	14	
<i>Enterococcus faecalis</i>	51299	-	-	-	-	-	-	20	10	-	-	-	16	-	-	-	2	
Gram (-) <i>Shigella sonnei</i>	25931	2	2	2	2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	2	-	2	nr
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Citrobacter freundii</i>	8090	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13866	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Enterobacter aerogenes*</i>	1680	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Salmonella tify</i>	19430	30	30	30	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i>	11229	-	-	2	12	-	-	6	-	-	12	-	12	-	12	2	12	
<i>Proteus mirabilis*</i>	305	-	12	-	12	12	12	12	-	-	12	12	16	12	16	-	18	
<i>Providencia stuartii</i>	29914	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	12	18	2	2	-	-	2	-	-	-	2	2	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i>	35218	12	12	-	16	2	-	-	-	-	-	-	-	-	12	2	-	
<i>Serratia marscescens</i>	4133	12	18	12	12	12	-	12	-	-	6	-	12	-	12	12	18	

nr: ensaio não realizado e * CDC.

A figura 94 ilustra algumas análises realizadas com as amostras de mel e os halos de inibição para o método de difusão em ágar. Observa-se nos ensaios a ausência de crescimento nas zonas de inibição. Uma vez selecionadas as amostras e as linhagens das quais apresentam significativa sensibilidade antibacteriana, obtiveram-se os representativos do teste de susceptibilidade para as diferentes concentrações de mel. Para o método de diluição em caldo e a determinação da CIM, a série correspondente às concentrações de tubos (da esquerda pra direita) foi: controle, 2, 3, 4, 5, 10, 20 e 30% (v/v) (figura 95). A tabela 18 mostra os valores da CIM para as amostras escolhidas. Nenhuma das concentrações apresentou atividade bactericida, apenas exibindo atividade bacteriostática. A amostra 17, Mel de Abelha Jataí não

participou dos ensaios microbiológicos por ter sido adquirida no fim da pesquisa e após encerrarem-se as análises microbiológicas.

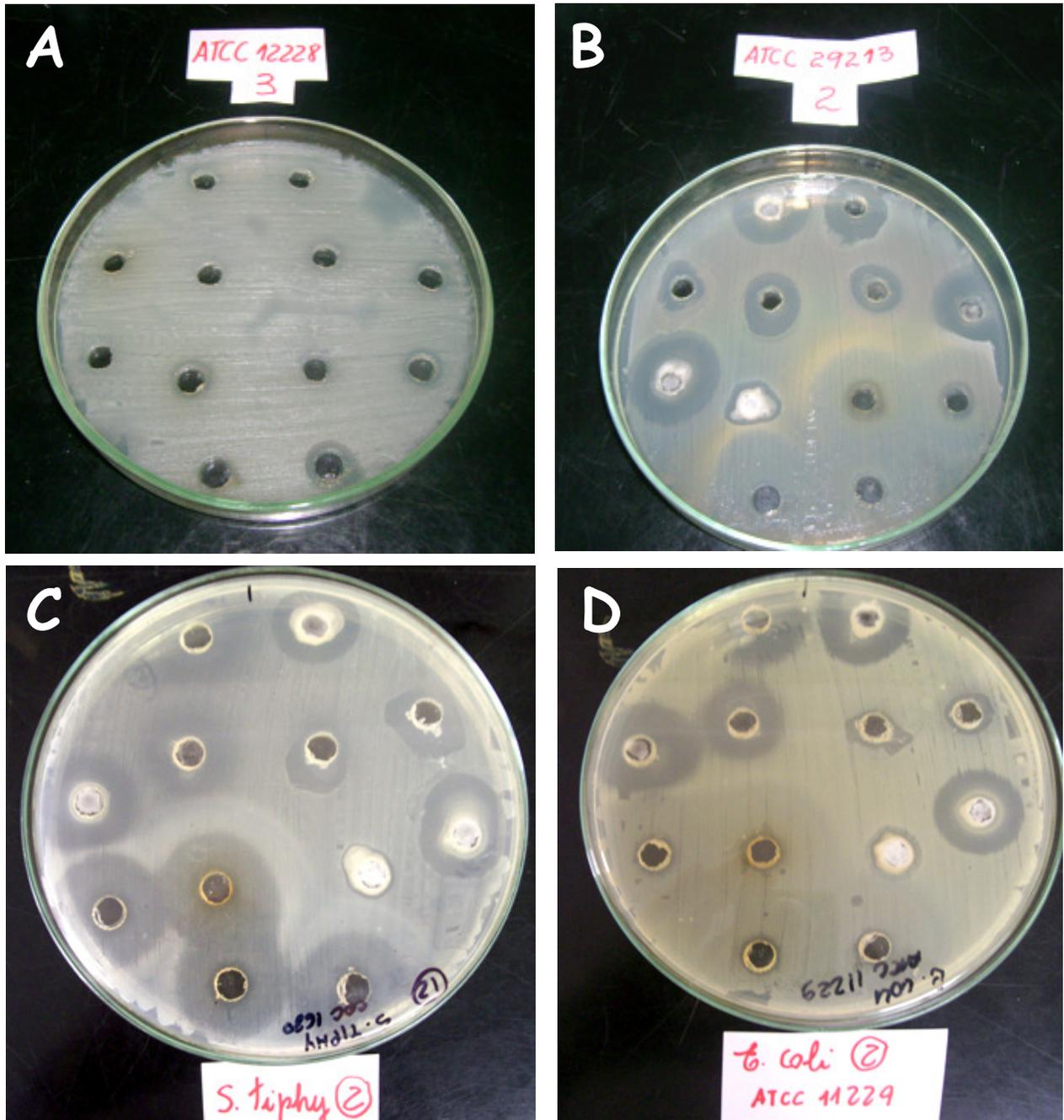


Figura 94: Representativo *in vitro* do teste de difusão em ágar Mueller Hinton para avaliação do potencial antimicrobiano de diferentes amostras de mel (100%) contra linhagens bacterianas. (A) *Staphylococcus epidermidis* ATCC[®] 12228, (B) *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213, (C) *Salmonella typhi* ATCC[®] 19430 e (D) *Escherichia coli* ATCC[®] 11229.

Tabela 18: Atividade antibacteriana *in vitro* e CIM (% v/v) de avaliação do potencial antimicrobiano das amostras de mel que obtiveram melhores resultados no teste de difusão em ágar.

Bactérias	ATCC® / CDC	Amostra de Mel (n°)							
		1	2	3	4	12	15	16	
		CIM (% v/v)							
Gram (+)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	30	30	> 30	30	> 30	> 30	20
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	30	30	> 30	30	nd	> 30	20
	<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	30	30	nd	30	> 30	> 30	20
Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>	11229	30	30	nd	30	nd	> 30	20
	<i>Escherichia coli</i>	35218	30	30	nd	30	nd	> 30	20
	<i>Salmonella tiphy</i>	19430	> 30	> 30	nd	nd	> 30	> 30	30
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	> 30	nd	nd	> 30	nd	nd	30

nd: não determinado devido ao alto valor de CIM.

Observa-se na figura 95A a ausência de crescimento na diluição 30% (v/v) correspondente à CIM para a amostra de mel número 4 (Cassutinga) contra a espécie *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228. Na figura 95B houve crescimento bacteriano em toda a série pela turvação do meio de cultura exibida pela amostra 3 (Rengue) contra cepas de *Escherichia coli* ATCC® 11229. Os testes foram feitos em triplicata com 200 testes em cada série totalizando 600 testes. Não foi utilizado concentrações maiores que 30% (v/v) de mel em função da dificuldade de análise do ensaio devido as características de cor e viscosidade das amostras que poderia levar a interpretações errôneas do teste de diluição em caldo. Nas amostras cujos resultados apresentaram a sigla “nd” verificou-se uma CIM indeterminada em função do alto valor da concentração para causar a inibição mínima.

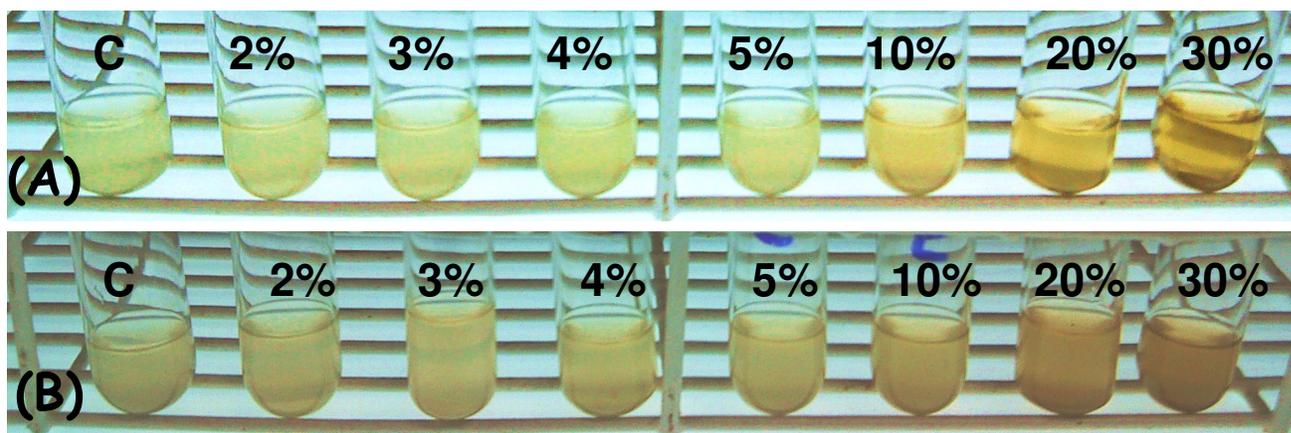


Figura 95: Representativo *in vitro* do teste de diluição em caldo Mueller Hinton e determinação do CIM contra as amostras bacterianas selecionadas no teste de difusão em ágar. Da esquerda para direita: controle (C) e concentrações do mel a 2, 3, 4, 5, 10, 20 e 30% (v/v). (A): Ausência de crescimento na diluição de 30% (v/v) e (B) crescimento bacteriano em toda a série pela turvação do meio de cultura.

7.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises microbiológicas *in vitro* demonstraram o potencial antimicrobiano do mel contra várias linhagens de bactérias patogênicas, especialmente os representantes Gram positivos causadores de infecções epidérmicas. O *Staphylococcus aureus* é uma espécie coagulase-positiva, de alta virulência e que coloniza a microbiota cutânea de cerca de 15% dos indivíduos. Algumas das suas manifestações clínicas são o impetigo (infecção da pele, que toma a forma de uma mácula e progride para pústula cheia de pus), foliculite (infecção purulenta do folículo piloso), além de colonizar feridas e processos em cicatrização onde tenha algum corpo ou material estranho, podendo-se espalhar para outras regiões do corpo. O *Staphylococcus epidermidis* caracterizado por ser coagulase negativa e catalase positiva é uma espécie comensal da pele e mucosas, responsável principalmente por infecções hospitalares, através de catéteres, sondas (material de plástico) bem como próteses, devida sua capacidade de formar biofilmes. Os biofilmes dificultam a chegada de drogas antimicrobianas e até mesmo de células fagocíticas ao foco de infecção. [177-180]

Das 12 espécies Gram negativas, os resultados do desafio antibacteriano foram mais significativos para *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella tify*, *Proteus mirabilis* e *Serratia marscences*. A espécie *E.coli* é uma enterobactéria aeróbia de habitat natural no lúmen intestinal dos seres humanos. As principais doenças relacionadas são intoxicações alimentares causando gastroenterites e infecções do trato urinário. [177-180]

A *P. aeruginosa* é uma bactéria aeróbia e baciliforme, capaz de viver em diversos ambientes desfavoráveis de seu habitat natural. Patógeno oportunista com grande capacidade de desenvolver resistências aos antibióticos e antisépticos de primeira escolha e importante causador de infecções hospitalares. Em indivíduos imunodeprimidos infecta o sistema pulmonar, urinário e sanguíneo, além de contaminar equipamentos médicos (catéteres e sondas) e tecidos que sofreram algum tipo de queimadura. [177-180]

A *S. tify* é responsável pela manifestação clínica da febre tifóide, podendo ser transmitida através da ingestão de alimentos ou água contaminada. Quando atingem o intestino invadem células especializadas do epitélio por mecanismos de endocitose ou invasão direta, atingindo após o sistema linfático sendo transportadas para todo o corpo. Os sintomas da doença são febre alta, dores de cabeça, fadiga, bradicardia, e agitação durante o sono. O quadro pode progredir para anorexia, hemorragia nasal, vômitos, esplenomegália, tosse, delírios e estado de torpor, surgindo depois quadros de septicemia, com possível choque séptico mortal. [177-180]

Serratia marscences e *Providencia stuartii* como representantes patogênicos menos frequentes são responsáveis por infecções nosocomias, do trato urinário, em feridas e bacteremias associadas ao uso de catéteres. A última quando infecta o sistema urinário, em função de estimular a alta atividade de urease e a excreção de amônia faz com a urina fique alcalina. [177-180]

Esse breve resumo, a respeito das bactérias sensíveis a ação antimicrobiana do mel alcançada pela pesquisa reforça substancialmente o potencial terapêutico do alimento. Em concordância às investigações científicas verificou-se que algumas amostras têm atividade antibacteriana representativa contra as principais linhagens (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*) causadoras de infecções cutâneas, em

queimaduras e processos invasivos cirúrgicos. Destacou-se também inibição do crescimento, no teste de difusão em ágar para espécies causadoras de gastroenterites e intoxicações alimentares como *Escherichia* e *Salmonella* fato também reportado em outras pesquisas com o mel.

7.5. CORRELAÇÃO DOS TEORES DE H₂O₂, CATALASE E A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS AMOSTRAS DE MEL

Sete das 16 amostras analisadas que obtiveram melhores resultados no primeiro desafio antibacteriano foram selecionadas para os ensaios de CIM, além do mel Eucalipto Teresópolis em função do elevado teor de H₂O₂ e baixo de catalase. Manuka +5, Laranjeira Japão, Rengue, Cassutinga, Assa-Peixe Juiz de Fora, Eucalipto Teresópolis e Juiz de Fora ao fim dos testes de diluição em caldo apresentaram-se com atividade bacteriostática e nenhuma desenvolveu efeito bactericida contra os microrganismos estudados. A concentração bacteriostática mínima para estas foi de 30% (v/v) sendo que o mel de Eucalipto Juiz de Fora foi o que obteve menor CIM, 20% (v/v). Ao fazer um comparativo entre a atividade antimicrobiana e o mel de Eucalipto Teresópolis, para os teores de H₂O₂ e catalase, este apresentou maior concentração de H₂O₂ (206 e 214 µg g⁻¹, respectivamente para, espectrofotometria e amperometria) e menor de catalase (9,97 UI mg⁻¹), o que ratifica a possível influência destes dois componentes no poder antimicrobiano das amostras. Pode-se justificar a ausência de halos de inibição nos testes de difusão em ágar em pela utilização do mel 100% puro nos orifícios do ágar. Estudos destacam que a atividade antibacteriana do mel quando relacionada ao H₂O₂ pode ser aumentada em função da diluição das amostras [54, 65, 66]. Provavelmente, as diluições no segundo ensaio podem ter influenciado os resultados de CIM bacteriostática para o mel Eucalipto Teresópolis. Entretanto, investigações futuras deverão ser realizadas para uma maior elucidação deste efeito.

Mel Manuka +5, Rengue, Assa-Peixe e Eucalipto Juiz de Fora apresentam níveis intermediários de H₂O₂, em µg g⁻¹ (123 e 98, 94 e 93, 70 e 71, 85 e 91, pela

determinação espectrofotométrica e amperométrica, respectivamente), logo suas atividades bacteriostáticas poderiam ser justificadas pela união dos fatores *não-peróxido* e o peróxido de hidrogênio presente. Por fim o mel de Laranjeira Japão mesmo com valores de H_2O_2 bem inferiores (32 e $40 \mu\text{g g}^{-1}$) às médias das determinações apresentou relativo poder antibacteriano. Para este, provavelmente, compostos fitoterápicos inerente à amostra, pH e osmolaridade são os determinantes de tal atividade terapêutica.

O estudo mais uma vez comprovou o poder antimicrobiano do mel, entretanto elucidar ou predispor qual o real fator ou o conjunto deles é o grande desafio das novas pesquisas diante da complexidade da matriz a ser analisada.

8. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Conclusões Finais

Em quase 5 anos de pesquisa, inicializadas no programa de mestrado que logo se consolidou em tese de doutorado, o desafio em trabalhar com o mel e a complexidade de sua matriz proporcionou a este pesquisador não só ampliar sua formação acadêmica e de conhecimento, mas de desenvolvimento e contribuição nas áreas da química enzimática e eletroanalítica. Agregar a interdisciplinaridade permitiu a aproximação de segmentos da ciência pouco ligados, especialmente pela nossa instituição, como a química analítica, microbiologia e botânica. De maneira geral, para o projeto inicial, este trabalho alcançou os objetivos gerais propostos como avaliar a potencialidade e desenvolver pesquisas em torno de rotas de imobilização enzimática associadas aos sistemas de injeção em fluxo bem como os detectores ópticos e eletroquímicos de análise na determinação de compostos de relevância farmacêutica. Não se pode esquecer a importância e o ganho analítico com uso dos eletrodos e sensores químicos modificados, aplicados a metodologia amperométrica no decorrer dos estudos.

Para alcançar os demais objetivos, o corpo desta tese dividiu-se em capítulos, onde os assuntos foram abordados de forma independente na sua construção e de acordo com a relevância, de forma interligada na parte final de cada etapa da pesquisa. A determinação geográfica e botânica das amostras com base na melissopalínologia revelou que nenhuma das amostras de mel apresentava características adulteradas, falsificadas ou de melato. As únicas dificuldades encontradas ocorreram com a análise microscópica do mel Velame pela presença de substâncias oleaginosas e os pólenes agrupados, com resultado inconclusivo, porém com características nectaríficas, e para as amostras rotuladas comercialmente como Assa-Peixe Teresópolis e Juiz de Fora. Nestas foi encontrado nas lâminas pólenes característicos do gênero *Vermonia* (*Asteraceae*), entretanto a representação da espécie polínica não foi suficiente para permitir a classificação da amostra como mel de Assa-Peixe. Fatores como longo período entre coleta, armazenamento e análise polínica podem estar associados a tal resultado. O mel de Abelha Jataí referiu-se não a origem floral e sim à abelha produtora

do mel, *Tetragonisca angustula*, e o resultado da melissopalínologia não apresentou predominância polínica monofloral, classificando-o como multifloral.

A metodologia espectrofotométrica e amperométrica diferencial para determinação de H_2O_2 associada ao sistema por injeção em fluxo e o uso de reatores tubulares enzimáticos imobilizados demonstrou ser uma técnica confiável para a quantificação dos teores deste analito nas amostras de mel. A otimização das quantidades de reagentes e os parâmetros das análises foram úteis em termos de economia de material e tempo, inclusive na adaptação do sistema em fluxo às técnicas e aos sistemas de detecção, apresentando uma alternativa de materiais simples e de baixo custo. No trabalho, a resina de troca aniônica Amberlite IRA-743 provou ser a mais adequada para uma imobilização rápida da peroxidase (cerca de 30 minutos) quando comparada a outras similares, com a obtenção de resultados rápidos, melhoria nas propriedades catalíticas, seletividade, estabilidade e menor manipulação de reagentes.

Estocagem e reutilização dos reatores imobilizados por pelo menos 4 semanas e um eficiente condicionamento das resinas Amberlite IRA-743, sem qualquer comprometimento na sua função, fez com que protocolos fossem desenvolvidos, com um maior controle dos processos operacionais. Tais protocolos avaliaram parâmetros, como metodologia aplicada, limitações, manutenção da atividade enzimática e reaproveitamento dos reatores tubulares. Eles foram importantes no andamento da pesquisa, inclusive na imobilização de outras matrizes enzimáticas, como a catalase. Infelizmente, por motivos de ajustes instrumentais, a metodologia espectrofotométrica de determinação do H_2O_2 não pode ser adaptada para determinações *on line*, por isso a necessidade da coleta do produto reacional em balões volumétricos e uma posterior leitura de absorbância, algo que não ocorreu com as medidas amperométricas. As frequências analíticas para as técnicas citadas alcançaram 20 e 90 determinações h^{-1} , respectivamente.

As curvas analíticas para as duas determinações apresentaram-se bastante precisas com elevado grau de concordância entre resultados das análises com as amostras. A ampla faixa de linearidade da reta (0,5 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e um coeficiente de regressão linear igual a 0,99971 (espectrofotometria) e 0,99892 (amperometria)

provaram a correlação entre absorvância e corrente de oxidação do H_2O_2 , respectivamente, com as concentrações de peróxido de hidrogênio. A sensibilidade das técnicas foi confirmada com baixos limites de detecção e quantificação, $0,70 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,88 \mu\text{mol L}^{-1}$, para espectrofotometria; e $0,29 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,38 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a amperometria. O teor de H_2O_2 nas amostras de mel variaram entre $4,22 \mu\text{g g}^{-1}$ (Laranjeira Teresópolis) e $206,15 \mu\text{g g}^{-1}$ (Eucalipto Teresópolis), e valor médio de peróxido de hidrogênio, dos 17 exemplares, em $89,86 \mu\text{g g}^{-1}$. Com coeficientes de variância e recuperação médios de 4% e 96%, respectivamente, mostrou-se a precisão das determinações. Na determinação amperométrica, as concentrações de H_2O_2 ficaram entre $4,32 \mu\text{g g}^{-1}$ (Laranjeira Teresópolis) e $214,32 \mu\text{g g}^{-1}$ (Eucalipto Teresópolis), e valor médio de peróxido de hidrogênio, dos 17 exemplares, em $80,08 \mu\text{g g}^{-1}$. Com coeficientes de variância e recuperação médios de 3% e 94%, respectivamente, destacou-se também a precisão das análises.

A avaliação qualitativa entre as concentrações de H_2O_2 na determinação espectrofotométrica e amperométrica apresentaram-se equivalentes com uma correlação de grau muito forte, mesmo com possíveis fatores variantes entre as análises como tempo de estocagem, manipulação das amostras, variação de temperatura e diluição das matrizes. Assim tanto a espectrofotometria quanto a amperometria diferencial provaram serem técnicas de elevada seletividade, sensibilidade, precisão, robustez para a determinação dos teores de H_2O_2 nas amostras de mel.

Para a determinação dos teores de catalase, mais uma vez a medida amperométrica diferencial associada ao sistema FIA e a imobilização enzimática demonstrou uma grande potencialidade na investigação desta enzima, até agora algo inédito, em trabalhos com esse tipo de amostra. A maioria dos parâmetros e otimizações anteriores foram utilizados e bem adaptados a esta quantificação com obtenção de sinais transientes pouco dispersos e que não afetaram a magnitude dos resultados. Novamente a resina Amberlite IRA-743 apresentou melhores condições de imobilização e preferiu-se a utilização de uma bomba peristáltica, pois apresentaram uma vazão constante tanto para as análises quanto para a imobilização da catalase das amostras no suporte.

Protocolos de condicionamento e utilização enzimática, bem como procedimentos de reaproveitamento dos reatores tubulares e as resinas suportes estudadas para o processo de imobilização também foram realizados. A curva analítica apresentou-se precisa com elevado grau de concordância entre resultados, ampla faixa de linearidade da reta (100 a 5000 UI mL⁻¹) e coeficiente de regressão linear igual a 0,99709. Provou-se a sensibilidade da técnica com baixos limites de detecção e quantificação, 38 e 51 UI mL⁻¹.

Na determinação do teor de catalase nas amostras de mel os resultados variaram entre 9,97 UI mg⁻¹ (Eucalipto Teresópolis) e 99,07 UI mg⁻¹ (Cassutinga), o valor médio de peróxido de hidrogênio, dos 17 exemplares, foi de 58,68 UI mg⁻¹. Com coeficientes de variância e recuperação médios, de 3% e 103%, respectivamente, mostrou-se a precisão das determinações. Da mesma forma, em relação aos experimentos amperométricos com o H₂O₂, seletividade, sensibilidade, robustez e elevada frequência analítica (cerca de 90 determinações h⁻¹) foram características inerentes à técnica.

Como foi relatado, na introdução desta tese, os níveis de catalase influenciam os teores de H₂O₂ no mel, fato este que poderia alterar a capacidade antimicrobiana, anti-séptica e as propriedades terapêuticas cicatrizantes das amostras. A pesquisa, ao quantificar esses dois componentes provou a relação inversa classificada de grau moderado ao forte para as amostras analisadas, demonstrando que a ligação entre os dois fatores e o possível poder terapêutico do mel não pode ser descartada.

A última parte da pesquisa preocupou-se em estudar o poder antimicrobiano dos méis a partir de testes microbiológicos em difusão em ágar e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima bacteriostática ou bactericida de cada amostra, além de correlacionar os teores de peróxido de hidrogênio e catalase, sua origem geográfica e botânica.

Os ensaios *in vitro* demonstraram o potencial antimicrobiano do mel contra várias linhagens de bactérias patogênicas, especialmente os representantes (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*) causadores de infecções epidérmicas, em queimaduras e em processos invasivos médico-cirúrgicos como sondas e catéteres. Destacou-se também inibição do crescimento, no teste de

difusão em ágar para espécies causadoras de gastroenterites e intoxicações alimentares como *Escherichia* e *Salmonella* fato também reportado em outras pesquisas com o mel.

Sete das 16 amostras analisadas que obtiveram melhores resultados nos testes de difusão foram selecionadas para os ensaios de CIM, além do mel Eucalipto Teresópolis em função do elevado teor de H_2O_2 e baixo de catalase. Manuka +5, Laranjeira Japão, Rengue, Cassutinga, Assa-Peixe Juiz de Fora, Eucalipto Teresópolis e Juiz de Fora ao fim dos testes de diluição em caldo apresentaram-se com atividade bacteriostática e nenhuma desenvolveu efeito bactericida contra os microrganismos estudados. A concentração bacteriostática mínima para estas foi de 30% (v/v) sendo que o mel de Eucalipto Juiz de Fora foi o que obteve menor CIM, 20% (v/v). A atividade antibacteriana do mel de Eucalipto Teresópolis pode ter sido influenciada pelas diluições no caldo bacteriano nos ensaios para determinação da CIM. A diluição das amostras é um fator importante relacionado à geração de teores ativos de H_2O_2 e quantificados em elevadas concentrações neste mel quando comparados aos outros exemplares. Entretanto, investigações futuras deverão ser realizadas para uma maior elucidação deste efeito. Para os outros exemplares associaram-se às atividades bacteriostáticas pela união dos fatores *não-peróxido* (pH, osmolaridade, compostos fitoterápicos) e/ou o peróxido de hidrogênio presente.

Por fim, a produção acadêmica da pesquisa proporcionou a apresentação de uma série de trabalhos em congressos e eventos como em 5 oportunidades na *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)* (2006, 2007₍₂₎, 2008 e 2010), 1 no *Congresso Brasileiro de Química - Associação Brasileira de Química (ABQ)* (2006) e 1 no *Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA)* (2007). Em duas ocasiões o trabalho foi apresentado na *Semana de Ciências Exatas (ICE), Departamento de Química (UFJF)* (2006 e 2007).

O pesquisador foi convidado também a expor suas pesquisas na forma de Sessão Coordenada e/ou Comunicação Oral durante a 30ª *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)* (2007) e no 46º *Congresso Brasileiro de Química - Associação Brasileira de Química (ABQ)* (2006). As apresentações não se restringiram apenas ao cenário nacional, em 2007, durante *Euroanalysis XIV*,

Antwerpen, Belgium e em 2009, em *The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Chicago, Illinois, USA*, dois trabalhos foram expostos à comunidade científica internacional intitulados como: *Content of hydrogen peroxide and trace metals in brazilian commercial honeys* e *Amperometric determination of catalase in brazilian commercial honeys*, respectivamente.

Três publicações internacionais em revistas de considerável impacto conforme classificação Capes / Qualis, completaram a importância e a relevância da pesquisa: *FRANCHINI, Rômulo Augusto de Abreu et al. Rapid determination of hydrogen peroxide using peroxidase immobilized on amberlite IRA-743 and minerals in honey. Journal of Agricultural and Food Chemistry (ISSN 0021-8561). v. 55, p. 6885-6890, 2007*, classificação qualis B1 (fator de impacto 2,469) [186]; *FRANCHINI, Rômulo Augusto de Abreu Franchini et al. Differential amperometric determination of hydrogen peroxide in honeys using flow-injection analysis with enzymatica reactor. Talanta (ISSN 0039-9140). v. 75, p. 301-306, 2008*, classificação qualis A2 (fator de impacto 3,290) [187] e *FRANCHINI, Rômulo Augusto de Abreu; MATOS, Maria Auxiliadora da Costa e MATOS, Renato Camargo. Amperometric determination of catalase in brazilian commercial honeys. Analytical Letters (ISSN 0003-2719). no prelo*, classificação qualis B3 (fator de impacto 1,317) [188].

Perspectivas

As determinações analíticas juntamente com a química enzimática são campos promissores da ciência em constante crescimento e investimentos, durante essas últimas décadas. A seletividade das enzimas e a sua capacidade em catalisar reações com substratos de baixas concentrações são extensivamente aplicadas na análise química, ambiental, médica e biotecnológica. O aumento da demanda das pesquisas e a necessidade do desenvolvimento de metodologias rápidas, confiáveis e de baixo custo fazem com que este segmento da ciência desenvolva-se cada vez mais a fim de suprir as necessidades das pesquisas futuras.

Com a crescente aclamação da comunidade científica em identificar e quantificar os componentes possivelmente encontrados no mel fica evidente a importância futura das pesquisas que envolvam este produto. A complexidade da matriz é um desafio para os pesquisadores e a determinação de sua composição química tem vários propósitos analíticos além da simples verificação da adulteração ou controle de qualidade do alimento. Outrossim, a identificação de compostos farmacologicamente ativos aumenta com o crescente apelo da medicina em explorar seu potencial como agente antimicrobiano, cicatrizante, antiinflamatório, antioxidante e anticanceroso. Um melhor desenvolvimento farmacotécnico e uma maior aceitação terapêutica dos produtos com tais atividades só será possível com a completa caracterização química das amostras e sua correlação geográfica e botânica. Portanto algumas lacunas se abrem: como a real composição química e concentração dos componentes fitoterápicos? Como a catalase e glicose oxidase controlam realmente os teores de H_2O_2 ? Como a diluição das amostras, o tempo entre coleta/armazenagem e pesquisa influenciam nos teores destes? Como a fonte floral e a espécie de abelha poderá contribuir na presença destes compostos terapeuticamente ativos? Como a atividade antioxidante e antimicrobiana é realmente afetada por todos estes compostos, sendo apenas um único fator determinante ou a conjuntura deles? Existe alguma influência antagônica entre eles?

Enfim, é neste contexto de questionamentos que os pesquisadores devem aproximar cada vez mais segmentos da ciência como a química analítica, microbiologia, botânica, terapêutica, farmácia e medicina nos estudos futuros com o mel.

REFERÊNCIAS

- [1] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000, **Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7797>> Acesso em: 02 Set 2009.
- [2] ARAUJO, Dyalla Ribeiro; SILVA, Roberto Henrique Dias da; SOUSA, Jonas dos Santos. Avaliação da qualidade físico-química do mel comercializado na cidade de Crato, CE. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 1, p. 51-55, 2006.
- [3] VILHENA, Fabrício; ALMEIDA-MURADIAN, Lígia Bicudo de. **Manual de análises físico-químicas do mel**. São Paulo: Biblioteca USP, 1999, 23 p.
- [4] SOUZA, Bruno de Almeida et al. Caracterização do mel produzido por espécies de *Melipona illiger*, 1806 (*Apidae: Meliponini*) da região nordeste do Brasil: 1. Características físico-químicas. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 303-308, 2009.
- [5] PATACA, Luiz Carlos Moutinho. **Análises de mel e própolis utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração**. 2006. 97 p. Tese (Doutorado em Ciências, Área de concentração: Química Analítica). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas (SP), 2006.
- [6] ALVES, Rogério Marcos de Oliveira et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (*Hymenoptera: Apidae*). **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 640-650, 2005.
- [7] VARGAS, Taís. **Avaliação da qualidade do mel produzido na região de campos gerais do Paraná**. 2006. 134 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa (PR), 2006.
- [8] ALMEIDA-MURADIAN, Lígia Bicudo de; MATSUDA, Adriana Hitomi; BASTOS, Deborah Helena Markowicz. Physicochemical parameters of amazon *Melipona* honey. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 707-708, 2007.
- [9] BERA, Alexandre; ALMEIDA-MURADIAN, Lígia Bicudo de. Propriedades físico-químicas de amostras comerciais de mel com própolis do estado de São Paulo. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 49-52, 2007.
- [10] MARCHINI, Luís Carlos et al. Physicochemical composition of *Apis mellifera* honey samples from São Paulo state, Brazil. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1653-1657, 2007.

[11] SOUZA, Bruno et al. Composition of stingless bee honey: setting quality standards. **Interciência**, v. 31, n. 12, p. 867-875, 2006.

[12] BOGDANOV, Stefan; MARTIN, Peter. Honey authenticity: a review. **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v. 93, p. 232-254, 2002.

[13] KELLY, J. F. Daniel; DOWNEY, Gerard; FOURATIER, Vanessa. Initial study of honey adulteration by sugar solutions using midinfrared (MIR) spectroscopy and chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.1, p. 33-39, 2004.

[14] BATH, Parminder Kaur; SINGH, Narpinder. A comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey. **Food Chemistry**, v. 67, p. 389-397, 1999.

[15] NOGUEIRA-NETO, Paulo. Árvores para as abelhas e para aves. **Mensagem Doce**. n. 100, art. 5, 2009. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/100/msg100.htm>> Acesso em 12 Jan 2010.

[16] VASCONCELLOS, Fernanda. Abelhas ajudam a entender o cérebro humano. **UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (UnB): UnB Agência**. Brasília, 09 Abr 2009. Disponível em: <<http://www.unb.br/noticias/unbagencia/unbagencia.php?id=1521>> Acesso em 12 Jan 2010.

[17] UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP). Instituto de Biociências. Departamento de Ecologia Geral. Laboratório de Abelhas. Abelhas nas flores. Disponível em: <<http://eco.ib.usp.br/beelab/florindex.htm>> Acesso em 12 Jan 2010.

[18] ANKLAM, Elke. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 549-562, 1998.

[19] MOREIRA, Ricardo Felipe Alves; DE MARIA, Carlos Alberto Bastos. Glicídios no mel. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.

[20] MORGADO, Leila Nunes. **Melissopalínologia**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Instituto de Zootecnia. Departamento de Produção Animal. Disponível em: <<http://www.iz.ufrrj.br/apicultura/melissop.htm>> Acesso em 08 Out 2009.

[21] UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP). Instituto de Biociências. Departamento de Ecologia Geral. Laboratório de Abelhas. Disponível em: <<http://www.webbee.org.br/pesquisa/melissopalino.htm>> e <<http://www.webbee.org.br/pesquisa/mel.htm>> Acesso em 08 Out 2009.

[22] BARTH, Ortrud Monika. **O Mel no pólen brasileiro**. Rio de Janeiro: Gráfica Luxor, 1989, 150 p.

[23] MAURIZIO, Anna; LOUVEAUX, Jean. **Pollens des plantes mellifères d'Europe**. Paris: U.G.A.F, 1965, 148 p.

[24] LOUVEAUX, Jean. Composition, propriétés et technologie du miel. In: CHAUVIN, Remy. **Traité de biologie de l'abeille**. Paris, France: Masson, 1968, p. 277-324.

[25] LOUVEAUX, Jean; MAURIZIO, Anna; VORWOHL, Günther. Commission internationale de botanique apicole de L'U.I.S.B. Lês méthodes de La méliisso-palynologie. **Apidologie**. v. 1, n. 2, p.211-227, 1970.

[26] MAURIZIO, Anna; VORWOHL, Günther. Methods of melissopalynology by International Commission for Bee Botany of IUBS. **Bee World**. v. 59, n. 4, p. 139-157, 1978.

[27] ERDTMAN, Gunnar. The acetolysis method: a revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**. v. 54, p. 561-564, 1960.

[28] IWAMA, Satoko; MELHEM, Therezinha S. The pollen spectrum of the honey of *T. angustulla* Latreille. **Apidologie**. v. 10, n. 3, p. 275-295, 1979.

[29] MELHEM, Therezinha S. et al. **Variabilidade polínica em plantas de Campos do Jordão (São Paulo, Brasil) - Boletim do Instituto de Botânica nº 16**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2003, 104 p.

[30] UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP). Instituto de Biociências. Departamento de Ecologia Geral. Laboratório de Abelhas. Disponível em: <<http://www.webbee.org.br/pesquisa/acetolise.htm>> Acesso em 12 Jan 2010.

[31] ZANDER, Enoch; MAURIZIO, Anna. **Handbuch der Bienenkunde 6. Der Honig**. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer, 1975, 212 p.

[32] SANTOS JUNIOR, Manoelito Coelho do; SANTOS, Francisco de Assis Ribeiro dos. Espectro polínico de amostras de méis coletadas na microrregião do Paraguassu, Bahia. **Magistra**. v. 15, n. especial entomologia, 2003.

[33] MAIA, Miguel; RUSSO-ALMEIDA, Paulo A.; PEREIRA, José O. Caracterização do Espectro Polínico dos Méis do Alentejo (Portugal). **Silva Lusitana**. v. 13, n. 1, p. 95-103, 2005.

[34] JILANI, Imtinen Ben Haj et al. Physicochemical properties and pollen spectra of honeys produced in Tunisia (southwest of Kef). **Apiacta**. v. 43, p. 43-48, 2008.

[35] MORETI, Augusta Carolina de Camargo Carmelo et al. Espectro polínico de amostras de mel de *Apis mellifera* L., coletadas na Bahia. **Bragantia**. v. 59, n. 1, p. 1-6, 2000.

[36] ALVES, Ricardo Marcos de Oliveira; CARVALHO, Carlos Alfredo Lopes de; SOUZA, Bruno Almeida de. Espectro polínico de amostras de mel de *Melípona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera: Apidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. v. 28, n. 1, p. 65-70, 2006.

[37] SOARES, Eliezer Rangel de Campos et al. Seleção de espécies melíferas com base na flora da região sudoeste do estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, n. 1, p. 726-728, 2007.

[38] FUJII, Ivete Arakaki et al. Caracterização físico-química do mel de guaranazeiro (*Paullinia cupana var. sorbilis*) em Alta Floresta, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 10, n. 3, p. 645-653, 2009.

[39] BOGDANOV, Stefan. **The book of honey (chapter 5)**. Bee Product Science: Honey composition, 2009, 13 p. Disponível em: <<http://www.bee-hexagon.net/en/honey.htm>> Acesso em 14 Jan 2010.

[40] CRANE, Eva. **Honey: a comprehensive survey**. London: Heinemann, 1975, 608 p.

[41] CRANE, Eva. **Livro do mel**. 1 ed. São Paulo: Nobel, 1983, 226 p.

[42] WHITE, Jonathan W. Quality evaluation of honey: role of HMF and diastase assays. Part II. **American Bee Journal**. v. 132, n.12, p.792-794, 1992.

- [43] WHITE, Jonathan W. The role of HMF and diastase assays in honey quality evaluation. **Bee World**. v. 75, n. 3, p. 104-107, 1994.
- [44] CARVALHO, Carlos Alfredo Lopes de et al. **Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. Série Meliponicultura Nº 4**. 1 ed. Cruz das Almas (BA): Insecta, 2005, 32 p.
- [45] YILMAZ, Hayrullah; YAVUZ, Ömer. Content of some trace metals in honey from south-eastern Anatolia. **Food Chemistry**. v. 65, p. 475-476, 1999.
- [46] DAVIES, A. M. C. Amino acid analysis of honeys from eleven countries. **Journal of Apicultural Research**. v. 14, p. 29-39, 1975.
- [47] IGLESIAS, Maria Teresa et al. Usefulness of amino acids composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 84-89, 2004.
- [48] BOGDANOV, Stefan; MARTIN, Peter; LULLMAN, C. Harmonised Methods of the European Honey Commission. **Apidologie**. special issue, p. 1-59, 1997.
- [49] WHITE, Jonathan W. Composition of honey. In: CRANE, Eva. **Honey: a comprehensive survey**. London: Heinemann edition, 1975, p. 157-206.
- [50] BOGDANOV, Stefan. **The book of honey (chapter 7)**. Bee Product Science, Honey for nutrition and health, 2009, 29 p. Disponível em: <<http://www.bee-hexagon.net/en/honey.htm>> Acesso em 14 Jan 2010.
- [51] DUSTMANN, Jost H. Über die katalaseaktivität in Bienenhonig aus der tracht der heidekrautgewächse (*ericaceae*). **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**. v. 145, p. 292-295, 1971.
- [52] DUSTMANN, Jost H. Antibacterial Effect of Honey. **Apiacta**. v. 14, p. 7-11, 1979.
- [53] WESTON, Roderick J. The contribution of catalase and other natural products to antibacterial activity of honey: a review. **Food Chemistry**. v. 71, p. 235-239, 2000.
- [54] THE UNIVERSITY OF WAIKATO. Department of biological sciences. Waikato Honey Research Unit. Honey as antimicrobial agent. Disponível em: <http://bio.waikato.ac.nz/honey/honey_intro.shtml> Acesso em 21 Ago 2009.

- [55] MOHAMMED, Seif Eldin Abdel Rahman; BABIKER, Elfadil Elfadl. Protein structure, physicochemical properties and mineral composition of *Apis mellifera* honey samples of different floral origin. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**. v. 3, n. 3, p. 2477-2483, 2009.
- [56] HUIDOBRO, José F. et al. Diastase, invertase and β -glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain. **Journal of Apicultural Research**, v. 34, n.1, p. 39-44, 1995.
- [57] PERSANO ODDO, Livia; PIAZZA, Maria Gioia; PULCINI, Patrizio. Invertase activity in honey. Instituto Sperimentale per La Zoologia Agrária, Sezione di Apicoltura, Roma, Itália. Disponível em:
<<http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/miel/it%20invertasa%20en%20miel.pdf>>
Acesso em 22 Jan 2010.
- [58] SERRANO, Salud et al. Diástase and invertase activities in Andalusian honeys. **International Journal of Food Science & Technology**. v. 42, n. 1, p. 76-79, 2006.
- [59] SANCHEZ, Maria Del Pilar et al. Evolution of catalase activity during the storage of honey. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**. v. 101, n. 2, p. 62-65, 2005.
- [60] HUIDOBRO, José F. et al. Precise method for the measurement of catalase activity in honey. **Journal of AOAC International**. v. 88, n. 3, p. 800-804, 2005.
- [61] BOGDANOV, Stefan. **The book of honey (chapter 1)**. Bee Product Science: A short history of honey, 2009, 5 p. Disponível em: <<http://www.bee-hexagon.net/en/honey.htm>> Acesso em 14 Jan 2010.
- [62] WHITE, Jonathan W. History of honey. In: CRANE, Eva. **Honey: a comprehensive survey**. London: Heinemann edition, 1975, p. 439-488.
- [63] SATO, Tomoi; MIYATA, Go. The nutraceutical benefit, part III: honey. **Nutritional Pharmaceuticals**. v. 16, p. 468-469, 2000.
- [64] BOGDANOV, Stefan. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**. v. 30, n.7, p.748-753, 1997.
- [65] MOLAN, Peter Charles. The antibacterial activity of honey 1. The nature of the antibacterial activity. **Bee World**. v. 73, p. 5-28, 1992.

- [66] MOLAN, Peter Charles. The antibacterial activity of honey 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. **Bee World**. v. 73, p. 59-76, 1992.
- [67] WAHDAN, H. A. L. Causes of the antimicrobial activity of honey. **Infection**. v. 26, n. 1, p. 26-35, 1998.
- [68] TAORMINA, Peter J.; NIEMIRA, Brendan A.; BEUCHAT, Larry R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. **International Journal of Food Microbiology**. v. 69, p. 217-225, 2001.
- [69] ALLEN, Kerry L.; MOLAN, Peter Charles; REID, G. M. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 43, p. 817-822, 1991.
- [70] WHITE, Jonathan W.; SUBERS, Mary H.; SCHEPARTZ, Abner I. The Identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 73, p. 57-70, 1963.
- [71] SUÁREZ-LUQUE, Silvia et al. Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 955, p. 207-214, 2002.
- [72] MATO, Inés et al. Significance of nonaromatic organic acids in honey. **Journal of Food Protection**. v. 66, n. 12, p. 2371-2376, 2003.
- [73] MATO, Inés et al. Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 1541-1550, 2006.
- [74] NAVARRETE, Miguel et al. Direct determination of aliphatic acids in honey by coelectroosmotic capillary zone electrophoresis. **Journal of Apicultural Research**. v. 44, n. 2, p. 65-70, 2005.
- [75] HAVSTEEN, Bent H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 96, p. 67-202, 2002.
- [76] CUSHNIE, T. P. Tim; LAMB, Andrew J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 26, p. 343-356, 2005.

[77] THE UNIVERSITY OF WAIKATO. Department of biological sciences. Waikato Honey Research Unit: Research interests. Disponível em: <<http://bio.waikato.ac.nz/honey/research.shtml>> Acesso em 21 Ago 2009.

[78] THE UNIVERSITY OF WAIKATO. Department of biological sciences. Waikato Honey Research Unit: Manuka honey as a medicine. Disponível em: <<http://bio.waikato.ac.nz/pdfs/honeyresearch/bioactives.pdf>> Acesso em 21Ago 2009.

[79] THE UNIVERSITY OF WAIKATO. Department of biological sciences. Waikato Honey Research Unit: What's special about active Manuka honey? Disponível em: <<http://bio.waikato.ac.nz/honey/special.shtml>> Acesso em 21 Ago 2009.

[80] THE UNIVERSITY OF WAIKATO. Department of biological sciences. Waikato Honey Research Unit: Rating the antibacterial activity of Manuka honey. Disponível em: <<http://bio.waikato.ac.nz/pdfs/antibacterial.pdf>> Acesso em 21 Ago 2009.

[81] MOLAN, Peter Charles. Honey as a topical antibacterial agent for treatment of infected wounds. **World Wide Wounds**. Hamilton, Nova Zelândia, 11 p., 2009. Disponível em: <<http://www.worldwidewounds.com/2001/november/Molan/honey-as-topical-agent.html>> Acesso em 21 Ago 2009.

[82] NZ PLANT PICS. Manuka: The New Zealand Tea Tree. Disponível em: <http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.nzplantpics.com/pics_shrubs/new_zealand_tea_tree/manuka_tea_tree_16.jpg&imgrefurl=http://www.nzplantpics.com/pics_shrubs/new_zealand_tea_tree/manuka_photography.htm&usq=__hWC5QvMjewW9g5orqA30LcKqtOs=&h=377&w=500&sz=41&hl=pt-BR&start=2&um=1&itbs=1&tbnid=_yy5Zml6wUjveM:&tbnh=98&tbnw=130&prev=/images%3Fq%3DManuka%26um%3D1%26hl%3Dpt-BR%26client%3Dfirefox-a%26sa%3DN%26rls%3Dorg.mozilla:pt-BR:official%26tbs%3Disch:1> Acesso em 05 mar 2010.

[83] WILLIX, D. J.; MOLAN, Peter Charles; HARFOOT, C. G. A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 73, p. 388-394, 1992.

[84] WESTON, Roderick J.; MITCHELL, Kevin R.; ALLEN, Kerry L. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. **Food Chemistry**. v. 64, p. 295-301, 1999.

[85] WESTON, Roderick J.; BROCKLEBANK, Lise K.; LU, Yinrong. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. **Food Chemistry**. v. 70, p. 427-435, 2000.

- [86] SHAMALA, Tumkur Ramachandriah; JYOTHI, Yeleswarapu Pattabhiram Shri; SAIBABA, Palle. Antibacterial effect of honey on the *in vitro* and *in vivo* growth of *Escherichia coli*. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**. v. 18, p. 863-865, 2002.
- [87] MIORIN, Patrícia Laguna et al. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 95, p. 913-920, 2003.
- [88] MUNDO, Melissa A.; PADILLA-ZAKOUR, Olga I.; WOROBO, Randy W. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. **International Journal of Food Microbiology**. v. 97, p. 1-8, 2004.
- [89] LUSBY, Patricia E.; COOMBES, Alexandra L.; WILKINSON, Jenny M. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. **Archives of Medical Research**. v. 36, p. 464-467, 2005.
- [90] BRUDZYNSKI, Katrina; Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 52, n. 12, p. 1228-1237, 2006.
- [91] IRISH, Julie et al. Honey has antifungal effect against *Candida* species. **Medical Micology**. v. 44, n. 3, p. 289-291, 2006.
- [92] LIN, S. M.; MOLAN, Peter Charles; CURSONS, R. T. The in susceptibility of *Compylobacter* spp. to the antibacterial effect of manuka honey. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 28, p. 339-344, 2009.
- [93] LEE, Hyungjae; CHUREY, John J.; WOROBO, Randy W. Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of Honey. **International Journal of Food Microbiology**. v. 126, p. 240-244, 2008.
- [94] COOPER, Rose; MOLAN, Peter Charles. The use of honey as an antiseptic in managing *Pseudomonas* infection. **Journal of Wound Care**. v. 8, n. 4, p. 161-164, 1999.
- [95] AL-WAILI, Noori S. Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. **Journal of Medicinal Food**. v. 7, n. 2, p. 210 -222, 2004.

- [96] BADAWEY, O. F. H. et al. Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* infection. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**. v. 23, n. 3, p. 1011-1022, 2004.
- [97] MEDA, Aline et al. Therapeutic uses of honey and honeybee larvae in central Burkina Faso. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 95, p. 103-107, 2004.
- [98] GAREDEW, Assegid; SCHMOLZ, Erik; LAMPRECHT, Ingolf. Microcalorimetric investigation on the antimicrobial activity of honey of the stingless bee *Trigona spp.* and comparison of some parameters with those obtained with standard methods. **Thermochimica Acta**. v. 415, p. 99-106, 2004.
- [99] SNOW, Melanie J.; MANLEY-HARRIS, Merylyn. On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey. **Food Chemistry**. v. 84, p. 145-147, 2004.
- [100] HENRIQUES, Ana; BURTON, Neil F.; COOPER, Rose A. Antibacterial activity of selected portuguese honeys. **Journal of Apicultural Research**. v. 44, n. 3, p. 119-123, 2005.
- [101] AL-WAILI, Noori S. et al. The antimicrobial potential of honey from United Arab Emirates on some microbial isolates. **Medical Science Monitor**. v. 11, n. 12, p.433-438, 2005.
- [102] VORLOVA, Lenka et al. The antimicrobial activity of honeys produced in the Czech Republic. **Czech Journal of Animal Science**. v. 50, n. 8, p. 376-384, 2005.
- [103] WILKINSON, Jenny M.; CAVANAGH, Heather M. A. Antibacterial activity of 13 honeys against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medicinal Food**. v. 8, n. 1, p. 100-103, 2005.
- [104] AL-JABRI, A. A. et al. Antibacterial activity of Omani honey alone and in combination with gentamicin. **Saudi Medical Journal**. v. 26, n. 5, p. 767-771, 2005.
- [105] PATTON, Thomas et al. Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to Manuka honey. **Journal of Microbiological Methods**. v. 64, p. 84-95, 2006.
- [106] BOUKRAA, Laid; ABDELLATIF, Niar. Sahara honey shows higher potency against *Pseudomonas aeruginosa* compared to north Algerian types of honey. **Journal of Medicinal Food**. v. 10, n. 4, p. 712-714, 2007.

- [107] KÜÇÜK, Murat et al. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. **Food Chemistry**. v. 100, p. 526-534, 2007.
- [108] BASUALDO, Claudia et al. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacterial usually isolated from skin wounds. **Veterinary Microbiology**. v. 124, p. 375-381, 2007.
- [109] PEREZ MARTIN, Rosa Ana et al. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of spanish honeys. **International Journal of Food Properties**. v. 11, n. 4, p. 727-737, 2008.
- [110] BASSON, Nicolaas J.; GROBLER, Sias R. Antimicrobial activity of two South African honeys produced from indigenous *Leucospermum cordifolium* and *Erica* species on selected micro-organisms. **BioMed Central (BMC) Complementary and Alternative Medicine**. v. 8, n. 41, 4 p., 2008. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-6882-8-41.pdf>> Acesso em 07 Mar 2010.
- [111] KOKOT, Zenon J. et al. Application of principal component analysis for evaluation of chemical and antimicrobial properties of honey bee (*Apis mellifera*) venom. **Journal of Apicultural Research**. v. 48, n. 3, p. 168-175, 2009.
- [112] GUERRINI, Alessandra et al. Ecuadorian stingless bee (Miliponinae) honey: a chemical and functional profile of an ancient health product. **Food Chemistry**. v. 114, p. 1413-1420, 2009.
- [113] TRUCHADO, Pilar et al. Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. **Food Chemistry**. v. 114, p. 1337-1344, 2009.
- [114] SALAZAR, Luis A. et al. *In vitro* antimicrobial activity of honey on mutans streptococci. **International Journal of Morphology**. v. 27, n. 1, p.77-82, 2009.
- [115] THE UNIVERSITY OF WAIKATO. Department of biological sciences. Waikato Honey Research Unit: Activity of honey against wound-infecting bacteria (including "superbugs"). Disponível em: <<http://bio.waikato.ac.nz/pdfs/honeyresearch/activity.pdf>> Acesso em 21 Ago 2009.
- [116] THE UNIVERSITY OF WAIKATO. Department of biological sciences. Waikato Honey Research Unit: The potential for using honey to treat wounds infected with MRSA and VRE Disponível em: <<http://bio.waikato.ac.nz/pdfs/honeyresearch/potential.pdf>> Acesso em 21 Ago 2009.

- [117] COOPER, Rose A.; MOLAN, Peter Charles; HARDING, K. G. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. **Journal of the Royal Society of Medicine**. v. 92, n. 6, p. 283-285, 1999.
- [118] COOPER, Rose A.; WIGLEY, P.; BURTON, Neil F. Susceptibility of multiresistant strains of *Burkholderia cepacia* to honey. **Letters in Applied Microbiology**. v. 31, p. 20-24, 2000.
- [119] COOPER, Rose A.; MOLAN, Peter Charles; HARDING, K. G. The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of Clinical significance isolated from wounds. **Journal of Applied Microbiology**. v. 93, p. 857-863, 2002.
- [120] COOPER, Rose A.; HALAS, E.; MOLAN, Peter Charles. The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**. v. 23, n. 6, p. 366-370, 2002.
- [121] FRENCH, Vanessa M.; COOPER, Rose A.; MOLAN Peter Charles. The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, p. 228-231, 2005.
- [122] ALANDEJANI, Talal et al. Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**. v. 141, n. 1, p. 114-118, 2009.
- [123] EDWARDS-JONES, Valerie; GREENWOOD, John E. What's new in burn microbiology? James Laing Memorial Prize Essay 2000. **Burns**. v. 29, p. 15-24, 2003.
- [124] ALVES, Diego Felipe Sampaio et al. Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melípona subnitida* em feridas infectadas de rato. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v. 35, n. 3, p. 188-193, 2008.
- [125] BOGDANOV, Stefan. **The book of honey (chapter 8)**. Bee Product Science: External applications of honey, 2009, 11 p. Disponível em: <<http://www.bee-hexagon.net/en/honey.htm>> Acesso em 14 Jan 2010.
- [126] MOLAN, Peter Charles. The role of honey in the management of wounds. **Journal of Wound Care**. v. 8, n. 8, p. 415-418, 1999.
- [127] DUNFORD, Cheryl; COOPER, Rose; MOLAN, Peter Charles. The use of honey in wound management. **Nursing Standard**. v. 15, n. 11, p. 63-68, 2000.

- [128] HENRIQUES, Ana et al. Free radical production and quenching in honeys with wound healing potential. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 58, p. 773-777, 2006.
- [129] SIMON, Arne et al. Medical honey for wound care – still the ‘latest resort’? **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)**. v. 6, n. 2, p. 165-173, 2009.
- [130] ZAGHLOUL, A. A. et al. Honey, a prospective antibiotic: extraction, formulation, and stability. **Pharmazie**. v. 56, n. 8, p. 643-647, 2001.
- [131] SUBRAHMANYAM, M. A prospective randomised clinical and histological study of superficial burn wound healing with honey and silver sulfadiazine. **Burns**. v. 24, p. 157-161, 1998.
- [132] SIMON, Arne et al. Wound care with antibacterial honey (Medihoney[®]) in pediatric hematology-oncology. **Support Care Cancer**. v. 14, p. 91-97, 2006.
- [133] GETHIN, Georgina; COWMAN, Seamus. Manuka honey vs. hydrogel – a prospective, open label, multicentre, randomized controlled trial to compare desloughing efficacy and healing outcomes in venous ulcers. **Journal of Clinical Nursing**. v. 18, p. 466-474, 2008.
- [134] ROBSON, Val; DODD, Susanna; THOMAS, Stephen. Standardized antibacterial honey (Medihoney[™]) with standard therapy in wound care: randomized clinical trial. **Journal of Advanced Nursing**. v. 65, n. 3, p. 565-575, 2009.
- [135] NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006, 1232 p.
- [136] RODWELL, Victor W.; KENNELLY, Peter J. Enzimas: propriedades gerais. In: MURRAY, Robert K. et al. **Harper: bioquímica**. São Paulo: Atheneu, 2002. 9. ed., caps. 8-11, p. 74-122.
- [137] MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo Batista. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, 387 p.
- [138] CARDOSO, Carmen Lúcia; MORAES, Marcela C.; CASS, Quezia B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.

- [139] WIKIPEDIA. Enzima. Disponível em: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/ba/Induced_fit_diagram_pt.svg> Acesso em 03 nov 2009.
- [140] DALLA-VECCHIA, Roberto; NASCIMENTO, Maria da Graça; SOLDI, Valdir. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- [141] MATEO, Cesar et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.
- [142] MARCONI, Walter. Immobilized enzymes: their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. **Reactive Polymers**, v. 11, p. 1, 1989.
- [143] BERTUCCI, Carlo et al. Drug affinity to immobilized target bio-polymers by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v.797, p. 111-129, 2003
- [144] MA, Junfeng et al. Recent advances in immobilized enzymatic reactors ad their applications in proteome analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 1-8, 2009.
- [145] SOUSA, Marcelo Valle de; FONTES, Wagner; RICART, Carlos André Ornelas. Análise de proteomas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 07, p.12-14, 1999.
- [146] JONES, Gretchen. D.; BRYANT JUNIOR., Vaughn. M. Melissopalynology. In: JANSONIUS, Jan; MCGREGOR, Dave Colin. **Palynology: principles and applications**. Salt Lake City, USA: American Association of Stratigraphic Palynologists Foudation, 1996, p. 933-938.
- [147] GOOGLE MAPS. Disponível em: <<http://maps.google.com.br/>>. Acesso em 24 mai 2010.
- [148] BARTH, Ortrud Monika; MELHEM, Therezinha S. **Glossário ilustrado de palinologia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1988, 75 p.
- [149] MATTOS, Ivanildo Luiz de et al. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. **Química Nova**. v. 26, n. 3. p. 373-380, 2003.

- [150] MATOS, Renato Camargo. **Sistemas amperométricos empregando matrizes de microeletrodos e análises simultâneas**. 2001. 135 p. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Química Analítica). Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), 2001.
- [151] MATOS, Renato Camargo; PEDROTTI, Jairo José; ANGNES, Lúcio. Flow-injection system with enzyme reactor for differential amperometric determination of hydrogen peroxide in rainwater. **Analytica Chimica Acta**. v. 441, p. 73-79, 2001.
- [152] OLIVEIRA, Ana Carolina Ayupe de et al. Flow-injection system with glucose oxidase immobilized on a tubular reactor for determination of glucose in blood samples. **Analytica Chimica Acta**. v. 535, p. 213-217, 2005.
- [153] SILVA, Vanézia Liane da et al. Enzymes immobilized on a tubular reactor for fast amperometric determination of glucose in brazilian honey. **Analytical Letters**. v. 42, p. 154-165, 2009.
- [154] MANZOORI, Jamshid L.; AMJADI, Mohammad; OROOJI, Maghsoud. Application of crude extract of Kohlrabi (*Brassica oleracea gongylodes*) as rich source of peroxidase in the spectrofluorometric determination of hydrogen peroxide in honey samples. **Analytical Sciences**. v. 22, p. 1201-1206, 2006.
- [155] REIS, Boaventura Freire dos. **Análise química em fluxo: princípios e aplicações**. 1998. 102 p. Trabalho (Laboratório de Química Analítica Professor Henrique Bergamin Filho). Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo, Piracicaba (SP), 1998.
- [156] REIS, Boaventura Freire dos; BERGAMIN FILHO, Henrique. Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 16, n. 6, p. 570-573, 1993.
- [157] REIS, Boaventura Freire dos; GINÉ, Maria Fernanda; KRONKA, Eloisa Aparecida Mocheuti. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**. v. 12, n. 1, p. 82-91, 1989.
- [158] HANSEN, Elo Harald. Exploiting kinetic-based flow-injection methods for quantitative chemical assays. **Analytica Chimica Acta**. v. 261, n.1-2, p. 125-136, 1992.
- [159] BENTHIN, Stig; NIELSEN, Jens; VILLADSEN, John. Flow-injection analysis of micromolar concentrations of glucose and lactate in fermentation media. **Analytica Chimica Acta**. v. 261, n.1-2, p. 145-153, 1992.

- [160] MATOS, Renato Camargo et al. Propulsor pneumático versátil e isento de pulsação para sistemas de análise de injeção em fluxo. **Química Nova**. v. 24, n. 6, p. 795-798, 2001.
- [161] NICELL, James A.; WRIGHT, Harold. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 21, p. 302-310, 1997.
- [162] CALLEGARI-JACQUES, Sídia M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre (RS): Artmed, 2003, 255 p.
- [163] MATOS, Renato Camargo et al. Flow injection analysis-amperometric determination of ascorbic and uric acids in urine using arrays of gold microelectrodes modified by electrodeposition of palladium. **Analytica Chimica Acta**. v. 404, n.1, p. 151-157, 2000.
- [164] SKOOG, Douglas; HOLLER, James; NIEMAN, Timothy. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre (RS): Bookman, 2002, 836 p.
- [165] BRETT, Ana Maria Oliveira; BRETT, Christopher M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Coimbra, Portugal: Livraria Almedina, 1996, 471 p.
- [166] HARRIS, Daniel C. **Análise química quantitativa**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005, 876 p.
- [167] SKOOG, Douglas et al. **Fundamentos de química analítica**. 8 ed. São Paulo: Thomson, 2005, 999 p.
- [168] MATOS, Renato Camargo et al. Amperometric differential determination of ascorbic acid in beverages and vitamin c tablets using a flow cell containing an array of gold microelectrodes modified with palladium. **Electroanalysis**. v. 10, n. 13, p. 887-890, 1998.
- [169] MATOS, Renato Camargo et al. Modified microelectrodes and multivariate calibration for flow injection amperometric simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, epinephrine and dipyrone. **Analyst**. v. 125, n. 11, p. 2011-2015, 2000.
- [170] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) / NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S17, 177 p., 2005. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.

[171] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) / NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eighth Edition. NCCLS document M2-A8, v. 23, n. 1, 58 p., 2003. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

[172] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) / NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. NCCLS document M7-A6, v. 23, n. 2, 53 p., 2003. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

[173] ATCC® (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION): THE GLOBAL BIORESOURCE CENTER™. Disponível em: <www.atcc.org> Acesso em 04 mai 2010.

[174] PROBAC DO BRASIL. *E-test*® para a determinação de CIM de anitibióticos. Disponível em: <<http://www.probac.com.br/bulas/bula-etest-antibioticos.pdf>>, Acesso em 12 set 2010.

[175] KELLY, Linda M.; JACOBS, Michael R.; APPELBAUM, Peter C. Comparison of agar dilution, microdilution, Etest, and disc diffusion to test the activity of trovafloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 43, p.707-709, 1999.

[176] WIKIPEDIA. *Epsilometer test*. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Epsilometer_test>, Acesso em 12 set 2010.

[177] TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo (SP): Atheneu, 2008, 780 p.

[178] KONEMAN, Elmer W et al. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5 ed. Philadelphia (USA): Lippincott Williams & Wilkins, 1997, 1395 p.

[179] MURRAY, Patrick R. Et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed. Washigton, DC (USA): American Society of Microbiology, 1999, 2488 p.

[180] OPLUSTIL, Carmem Paz et al. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. 2 ed. São Paulo (SP): Sarvier, 2004, 340 p.

- [181] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. **Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/microbiologia/mod_4_2004.pdf> Acesso em 06 Mai 2010.
- [182] BIER, Otto. Técnicas Bacteriológicas. In: **Microbiologia e Imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1990, 30 ed, 931 p.
- [183] ALVIANO, Wagner S. et al. *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology**. v. 53, p. 545-552, 2008.
- [184] ALMEIDA, Camila G. de et al. Antibacterial activity of lipophilic fluorquinolone derivatives. **Medicinal Chemistry**. v. 5, n. 5, p. 1-3, 2009.
- [185] BATISTA, Paulo Sérgio. **Análise do efeito do spray de nitrogênio líquido em culturas de bactérias *Enterococcus faecalis* – estudo *in vitro***. 2006. 96 p. Tese (Doutorado em Odontologia, Área: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUC-RS, Porto Alegre (RS), 2006.
- [186] FRANCHINI, Rômulo Augusto de Abreu et al. Rapid determination of hydrogen peroxide using peroxidase immobilized on Amberlite IRA-743 and minerals in honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 6885-6890, 2007.
- [187] FRANCHINI, Rômulo Augusto de Abreu et al. Differential amperometric determination of hydrogen peroxide in honeys using flow-injection analysis with enzymatic reactor. **Talanta**. v. 75, p. 301-306, 2008.
- [188] FRANCHINI, Rômulo Augusto de Abreu; MATOS, Maria Auxiliadora da Costa e MATOS, Renato Camargo. Amperometric determination of catalase in brazilian commercial honeys. **Analytical Letters**. *no prelo*.