

Biosensor Based on Brut Extract from Laccase (*Pycnopus sanguineus*) for Environmental Analysis of Phenolic Compounds

E.S. Gil, * L. Muller, M.F. Santiago, T.A. Garcia

UFG - Faculdade de Farmácia - Av. Universitária com 1ª Avenida s/n, Setor Universitário
CEP: 74605-220 - Goiânia - Goiás - Brasil

Received 25 April 2008; accepted 28 October 2008

Abstract

Laccase is a poliphenoloxidase enzyme that catalyzes the oxidation of catechol compounds in the corresponding quinones. The current obtained in this redox process can be used for quantitative analysis. In this work, a carbon paste biosensor modified with a crude enzymatic extract of the *Pycnopus sanguineus* fungi as a laccase source is proposed for catechol determination and other phenolic compounds. The effect of carbon paste and electrolyte composition, pH from 3.0 to 8.0, scan rate from 10 to 40 mVs⁻¹ and potential pulse amplitude from 10 to 60 mV on the differential pulse voltammetric response was investigated. The analytical curves were linear in the catechol concentration range from 2.0×10^{-5} to 7.0×10^{-4} molL⁻¹, with detection limits of 4.5×10^{-6} molL⁻¹. This biosensor was used for the determination of different kind of phenolic compounds, presenting better response for catechol, hydroquinone and resorcinol.

Keywords: biosensor, laccase, phenolic compounds, crude enzymatic extract, catechol.

Introdução

Os compostos fenólicos encontram-se largamente distribuídos no meio ambiente como poluentes orgânicos e podem ser oxidados por eletrodos carbonáceos convencionais em potenciais geralmente altos (0.8 V vs. ECS). Em tais condições de sobrevoltagem, estes compostos podem dimerizar sob oxidação eletroquímica e produzir outras espécies eletroativas (radicais), resultando em aumento dos níveis de corrente esperados. Em outros casos, podem ocorrer processos de adsorção ou formação de produtos poliméricos com passivação do eletrodo, observando-se picos com intensidades muito abaixo da esperada. O alto potencial

* Corresponding author. E-mail address: ericsgil@farmacia.ufg.br

aplicado eleva ainda os níveis de corrente de fundo, e conseqüentemente o nível de ruído [1-4]. Deste modo, o uso de eletrodos modificados com enzimas oxidases, aliado ao princípio da oxidação bioquímica seguida pela redução eletroquímica, pode anular ou minimizar estas variáveis [3-6]. Entre as enzimas mais utilizadas na confecção destes biossensores estão as lacases, tirosinases e as peroxidases [4-6].

A peroxidase de raiz forte (HRP, do inglês horseradish peroxidase) tem sido a mais utilizada, devido principalmente a sua alta estabilidade, baixo custo e resposta em um amplo intervalo de pH. A reação enzimática da peroxidase (HRP) ocorre em três etapas distintas, que se iniciam com a redução do H_2O_2 com passagem da enzima ao seu estado oxidado; seguindo-se pelo retorno da enzima ao estado nativo, via redução em duas etapas com oxidação de dois compostos doadores de elétrons. A sensibilidade de biossensores a base de HRP para compostos fenólicos é limitada pela corrente produzida pela transferência direta de elétrons entre enzima e eletrodo que ocorre na primeira etapa apenas na presença de peróxido, sendo interessante minimizar este processo para ganho em sensibilidade ao fenol [5]. No que diz respeito à seletividade de biossensores a base de peroxidase, observou-se entre 20 compostos fenólicos testados, maior sensibilidade para os compostos 2-amino-4-clorofenol e 4-cloro-3-metilfenol [6]. Por sua vez, enquanto a ação da tirosinase se restringe predominantemente ao fenol e orto benzenodióis, as lacases são capazes de oxidar vários substratos fenólicos, incluindo: fenóis e difenóis (*orto*, *meta* e *para*-benzenodióis), aminofenóis, catecolaminas, etc.

A lacase é uma polifenoloxidase produzida por diversos fungos, plantas e bactérias [7-9]. A enzima catalisa a oxidação de substratos fenólicos, tendo o O_2 molecular como agente para regeneração da forma ativa da enzima. Em geral as lacases contêm 4 átomos de cobre por molécula de enzima, embora existam enzimas com 2, 3 ou 6 átomos de cobre [7]. As lacases são produzidas pela maioria dos fungos basidiomicetos de decomposição branca, tais como *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus sp.*, etc., além de diversos ascomicetos e alguns deuteromicetos, como *Trichoderma sp.*

A especificidade pelos substratos varia, dependendo da origem da enzima; assim, lacases de diferentes fungos oxidam diferentes substratos, com diferentes velocidades de reação. Outrossim, o uso de mediadores de elétrons adequados, pode viabilizar a oxidação até de compostos não fenólicos e reduzir os sobrepotenciais necessários [5,6,11].

Deste modo, as lacases, assim como outras cuprooxidases (*tirosinase*, *ascorbato oxidase*, *ceruloplasmina* e *fenoxazinona sintetase*), apresentam grande potencial comercial para o desenvolvimento de biossensores.

Apesar da menor seletividade, a versatilidade da reação catalítica, demonstrada pela ampla variedade de condições (pH, força iônica, temperatura, solvente, etc.) em que se observa boa atividade enzimática, justifica o uso das lacases na confecção de biossensores para interesses analíticos diversos [4-8].

O desempenho do biossensor a base de *Lacase* depende entre outros fatores, da eficiência de imobilização, das condições de ensaio (pH, temperatura, solução

eletrolítica, mediadores), do número de enzimas imobilizadas por área superficial, sistema de transdução utilizado, bem como do(s) tipo(s) de enzima(s) empregada(s) [5,6,11-14].

No presente trabalho, foram desenvolvidos biossensores de pasta de carbono modificados com extrato enzimático bruto obtido de culturas do fungo *Pycnoporus sanguineus*, avaliando-se ainda o efeito do emprego de biopolímeros como soro albumina bovina (BSA) e glutaraldeído no desempenho do biossensor. A eficiência catalítica do extrato em solução e imobilizado no eletrodo de pasta de carbono foi avaliada frente a diferentes soluções de compostos fenólicos e em diferentes condições de eletrólito suporte. O biossensor de melhor desempenho foi avaliado quanto a sua aplicabilidade em águas residuárias.

Material e métodos

Reagentes

Todos os reagentes utilizados apresentaram grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água purificada pelo sistema Milli-Q (Modelo UV Plus Ultra low Organics Water). Soluções 10^{-2} molL⁻¹ de vários compostos fenólicos (Sigma S/A) foram preparadas em tampão fosfato 0.1 molL⁻¹ (pH 7.0). Solução de ABTS [(ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)] (Sigma S/A) 5 mmolL⁻¹ foi preparada em tampão acetato 50 mmolL⁻¹ (pH 4.8).

Instrumentação

O espectrômetro UV- visível Varian (modelo Cary 50 Bio) com célula de quartzo de 1 cm foi utilizado para ensaios de atividade enzimática. Todos os experimentos eletroquímicos foram executados num potenciostato/galvanostato Autolab (modelo PGSTAT 30).

Obtenção do extrato enzimático

Para obtenção do extrato utilizou-se um meio líquido de crescimento contendo extrato de malte e sulfato de cobre, tendo sido utilizado como indutor da lacase a 2.5-xilidina. O crescimento se deu sob agitação de 180 rpm, por 8 dias, à temperatura de 28 °C.

Estudo de atividade enzimática

Para ensaio enzimático utilizaram-se 25 µL do extrato diluído a 25% em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8, com o qual verificou-se a capacidade de descolorir 300 µL de solução de ABTS a 5 mM previamente dissolvida no mesmo tampão. A reação se deu a temperatura ambiente e a leitura espectrofotométrica foi realizada após 2 minutos de reação em 430 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a mudança de uma unidade de absorvância por minuto. O efeito de alguns eletrólitos e do pH também foi investigado sobre a atividade enzimática em solução.

Preparação dos biossensores

O biossensor foi preparado triturando-se 250 mg de grafite em pó com 25, 50 ou 100 μL de extrato bruto da lacase; 0, 10, 20 ou 40 μL de solução BSA 0.2% e 0, 25, 50 ou 75 μL de glutaraldeído por 15 minutos em almofariz (0.25 a 1 U/mg de pasta de carbono). A mistura foi completada pela adição de 80 mg de óleo mineral e homogenização por mais 15 minutos para produzir a pasta final. Uma porção adequada da pasta foi tomada para preencher cavidade de 2 mm de diâmetro por 0.5 mm de profundidade em eletrodo suporte (Fig. 1).

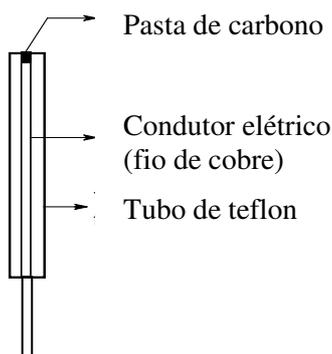


Figura 1. Eletrodo (transdutor) suporte para pasta de carbono.

Estudo de estabilidade e resposta relativa

Os biossensores obtidos com diferentes proporções de extrato bruto e aditivos foram inicialmente avaliados quanto a intensidade e tempo de resposta frente ao catecol. Os melhores sistemas foram avaliados quanto ao tempo em que até 90% da atividade inicial foi mantida.

Ensaio eletroquímico

Os parâmetros investigados na otimização do biossensor incluíram: pH (3.0 a 8.0), velocidade de varredura (5 a 40 mVs^{-1}) e amplitude de pulso (10 a 60 mV).

Voltametria cíclica

O comportamento do eletrodo na faixa de varredura de - 0.4 a 1.0 V foi avaliado através de sucessivos ciclos em tampão fosfato 0.1 molL^{-1} (pH 7.0) à velocidade de 50 mVs^{-1} .

Voltametria de pulso diferencial (VPD)

Determinações de catecol, hidroquinona, resorcinol, metil-cloro-fenol, aminofenol e acetaminofeno foram realizadas em solução de tampão fosfato 0.1 molL^{-1} (pH 7.0) não aeradas e não agitadas a 25 °C. A velocidade de varredura foi de 25 mVs^{-1} e a amplitude de pulso de 50 mV.

Estudos da influência do pH e eletrólitos suporte

Soluções de catecol 10⁻² molL^{-1} foram adicionadas em uma célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato 0.1 molL^{-1} em diferentes pH (3.0 a 8.0) ou

diferentes sais de potássio (fosfato, cloreto, acetato, nitrato e sulfato) na concentração 0.1 molL^{-1} pH 7.0 a fim de obter concentração de 0.5 mmolL^{-1} . O biossensor de pasta de carbono contendo 0.5 U de enzima/mg de pasta, a velocidade de varredura de 25 mVs^{-1} e faixa de potencial de 0.4 a 0 V foi empregado nesta investigação.

Estudo da resposta e aplicação do biossensor

Soluções 0.1 molL^{-1} de compostos fenólicos como catecol, hidroquinona, resorcinol, pirogólol, fenol, acetaminofeno, aminofenol, 2-cloro-fenol, 4-cloro-2-metil-fenol e nitro-fenol foram determinadas por voltametria de pulso diferencial com o biossensor anteriormente citado. O potencial foi varrido de +0.4 a -0.4 V a 100 mVs^{-1} em célula contendo tampão fosfato 0.1 molL^{-1} pH 7.0. Os percentuais de respostas foram dados em função dos níveis de pico de corrente catódica observados, sendo que o valor de resposta relativa (%) foi calculado em relação a resposta do catecol em 100%. As concentrações finais para todas as soluções contendo substâncias fenólicas foram de 0.5 mmolL^{-1} .

Para construção da curva de calibração, foram feitas adições sucessivas de solução de catecol 0.1 molL^{-1} a uma célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato 0.1 molL^{-1} pH 7.0. A corrente foi medida da solução inicial (branco) a final (catecol 0.5 mmolL^{-1}) por VPD a uma velocidade de varredura de 25 mVs^{-1} e a uma faixa de potencial de 0.4 a 0 V.

Os fenóis foram determinados em amostras de águas residuárias de quatro laboratórios universitários preparadas pelo método de adição múltipla de padrão. Em balão volumétrico de 50 mL, adicionaram-se 25 mL da amostra e completou-se o volume com tampão fosfato 0.2 molL^{-1} em pH 7.0. Uma alíquota de 10 mL desta solução foi transferida para célula eletroquímica, seguindo-se pela adição de solução padrão de catecol 0.1 molL^{-1} para obter as concentrações finais de 0.20, 0.50 e 0.80 mmolL^{-1} .

A corrente foi medida da solução inicial (branco) a final (catecol 0.8 mmolL^{-1}) por VPD a uma velocidade de varredura de 25 mVs^{-1} e a uma faixa de potencial de 0.4 a 0 V.

Resultados e discussão

O uso de lacases na confecção de biossensores tem sido bastante explorado por sua boa estabilidade e excelente atividade, bem como pelo fato destas oxidases dispensarem o uso de co-fatores ou mediadores eletroquímicos [4-6,11]. Outro fator positivo está na facilidade e segurança de produção, a qual envolve fungos não patogênicos; entre estes temos o *Pycnoporus sanguineus* cuja lacase ainda não havia sido avaliada no desenvolvimento de sensores. Os estudos iniciais de atividade enzimática para o extrato bruto desta enzima resultaram em uma excelente atividade de aproximadamente 2500 U/mL de extrato bruto, a qual se manteve estável por tempo de estocagem superior a 6 meses a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Entre as diversas técnicas de imobilização descritas na literatura optou-se pelo uso de transdutores de pasta de carbono por sua inerente simplicidade [6,11-14]. Assim, foram avaliadas diferentes composições, variando-se não somente a proporção de extrato enzimático, como também de aditivos comumente

utilizados no desenvolvimento de biossensores tais como, o glutaraldeído, que promove maior fixação da enzima ao eletrodo, e a albumina, que em geral confere à pasta características mais favoráveis à atividade enzimática. O eletrodo modificado de pasta de carbono que apresentou maior estabilidade e produziu maiores níveis de corrente catódica foi aquele composto por proporções intermediárias de extrato, albumina e glutaraldeído em sua composição, aqui denominado PCLbg e composto por 100 μL de extrato bruto de lacase, 250 mg de grafite, 80 mg de óleo mineral, 20 μL de solução BSA 0.2% e 5 μL de glutaraldeído. Entretanto, exceto pela pasta elaborada com menor proporção de extrato enzimático (25 μL), as variações observadas foram pouco significativas. Sendo que, considerado o valor da resposta do biossensor PCLbg ao catecol como 100%, os demais sistemas apresentaram respostas relativas (%) entre 95 e 99%. Deste modo o biossensor composto por 50 μL de extrato bruto, 250 mg de grafite e 80 mg de óleo mineral, e aqui denominado (PCL), por sua simplicidade e por apresentar desempenho e estabilidade comparável (> 60 dias) ao PCLbg (Fig. 2) foi adotado nos estudos de aplicação e otimização dos demais parâmetros.

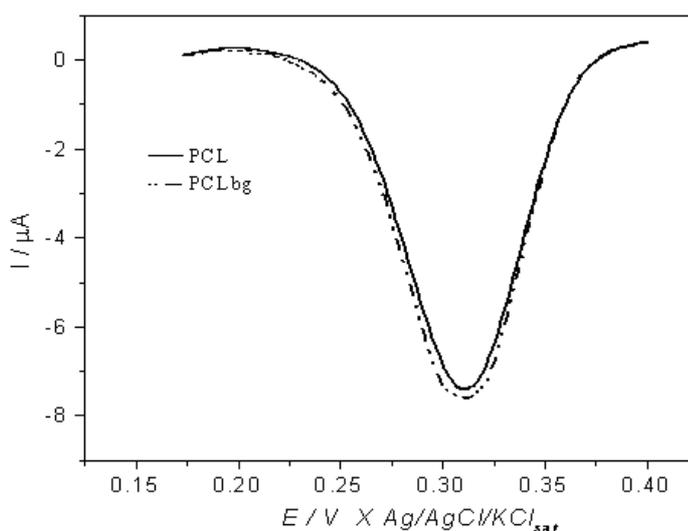


Figura 2. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para pasta de carbono modificada com extrato contendo lacase sem (PCL) e com BSA e glutaraldeído (PCLbg) em solução contendo 0.5 mmolL^{-1} de catecol. Tampão fostato 0.1 molL^{-1} pH 7.0; 0.4-0 V; 25 mVs^{-1} , pulso aplicado de 50 mV.

O comportamento dos eletrodos PCL e PCLbg, foi também avaliado por voltametria cíclica (Fig. 3). O comportamento redox do catecol apresentou ligeira redução do ΔE_p , em ensaios efetuados com estes eletrodos quando comparados ao eletrodo de pasta de carbono não modificado (PC). Fato que pode ser atribuído à melhora das propriedades condutoras da pasta pela adição de biopolímeros presentes no extrato ou BSA. Observa-se também em ensaios com PCL que com a redução do potencial de inversão para 0.4 V ocorre supressão total dos picos de redução (Fig. 3), fato que sugere que os picos catódicos observados nas Fig. 2 e 4 estão associados a quinona formada enzimaticamente e

não devido a sobrepotenciais de oxidação. Outrossim, o perfil dos voltamogramas cíclicos para o biossensor PCL se manteve constante após 20 ciclos, indicando boa estabilidade do sistema e que não ocorre lixiviação da enzima ou passivação do eletrodo.

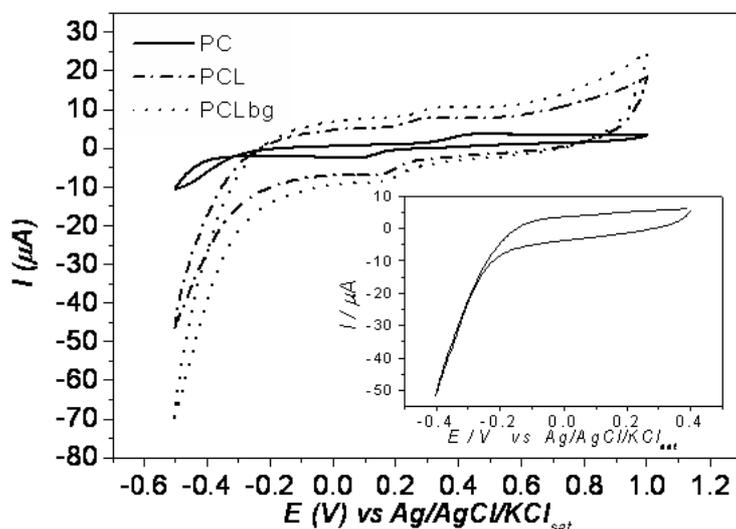


Figura 3. Voltamogramas cíclicos para catecol (0.5 mmolL^{-1}), utilizando o eletrodo de pasta de carbono não modificado (PC) e eletrodos PCL e PCLbg nas condições: tampão fosfato 0.1 molL^{-1} (pH 7.0); faixa de potencial: -0.5 a 1.0 V (-0.4 a 0.4 V); velocidade de varredura: 100 mVs^{-1} .

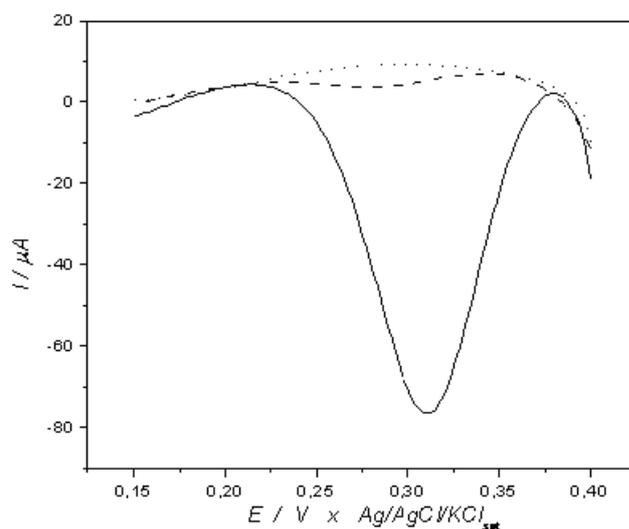


Figura 4. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para PC (- - -) e PCL (—) em solução contendo 0.8 mmolL^{-1} de catecol e PCL (.....) em solução tampão sem catecol. Tampão fosfato 0.1 molL^{-1} pH 7.0; 0.4-0 V; 30 mVs^{-1} , pulso aplicado de 50 mV.

No sentido de se comprovar a eficiência catalítica da enzima imobilizada, voltamogramas de pulso diferencial foram efetuados em condições idênticas para eletrodos de pasta de carbono não modificado e modificado (PCL). A Fig. 4

mostra diferenças expressivas entre os níveis de corrente observados para redução da quinona com biossensor (PCL) e o eletrodo de pasta de carbono (PC).

A Tabela 1 apresenta os valores ótimos em estudos de otimização para o biossensor de pasta de carbono modificada com extrato bruto de lacase (PCL).

Tabela 1. Parâmetros de otimização do PCL frente a soluções de catecol.

Parâmetro	Faixa estudada	Valor ótimo
Quantidade de enzima (U/mg de pasta)	0.25 – 1,0	1.0
Velocidade de varredura (mV s^{-1})	10 - 40	25
Amplitude de pulso (mV)	10 - 60	50
Faixa de varredura (V)	0.4 a -0.4	0.4 a 0
pH	3.0 – 8.0	6.5

No que diz respeito ao efeito do pH, os valores ótimos para atividade da enzima em solução e imobilizada foram respectivamente de 6.0 e 6.5. De modo que tanto para o biossensor PCL, quanto para enzima em solução, o melhor desempenho ocorre em pH neutro a ligeiramente ácido (Fig. 5). Este fato se associa a participação do próton no processo de redução e que em pHs extremos pode ocorrer ainda desnaturação protéica. Outrossim, o pH ótimo de cada enzima varia para cada composto fenólico ou tipo de substrato [14,15].

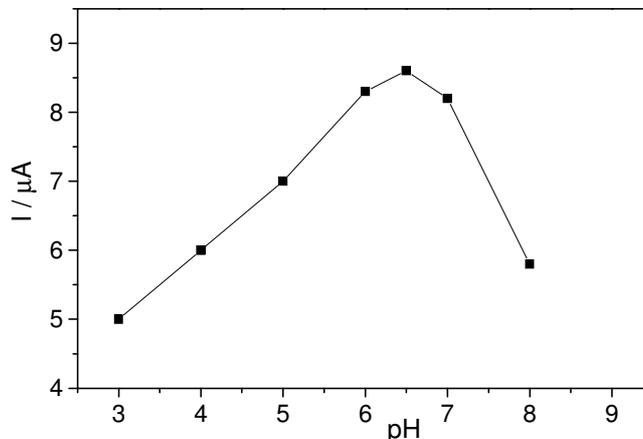


Figura 5. Estudo do pH sobre resposta do biossensor PCL em célula eletroquímica contendo tampão fosfato 0.1 molL^{-1} e catecol 0.5 mmolL^{-1} .

Já com relação ao efeito de eletrólitos, observou-se queda da atividade enzimática quando em presença de ânions coordenantes como o cloreto (Tabela 2). Tal efeito está diretamente vinculado à capacidade do ânion cloreto em se coordenar ao cobre do sítio ativo da enzima.

O biossensor PCL foi avaliado frente a vários compostos fenólicos (Fig. 6), apresentando melhor sensibilidade para catecol seguido pela hidroquinona e resorcinol; baixa atividade para acetaminofenol e aminofenol e atividade praticamente nula para 2-cloro-fenol, 4-cloro-2-metil-fenol e nitro-fenol.

A Fig. 7 apresenta as curva de calibração bem como voltamogramas de pulso diferencial obtidos para diferentes concentrações de catecol.

Tabela 2. Atividade relativa da lacase calculada em função da oxidação do catecol (0.5 mmolL^{-1}) em diferentes eletrólitos (0.1 molL^{-1} , pH 6.5).

Eletrólito	Atividade relativa (%)	
	Solução	PCL
Acetato de potássio	100%	100%
Fosfato de potássio	92%	93%
Sulfato de potássio	85%	88%
Nitrato de potássio	70%	69%
Cloreto de potássio	50%	48%
Cloreto de potássio 0.5 molL^{-1}	38%	40%

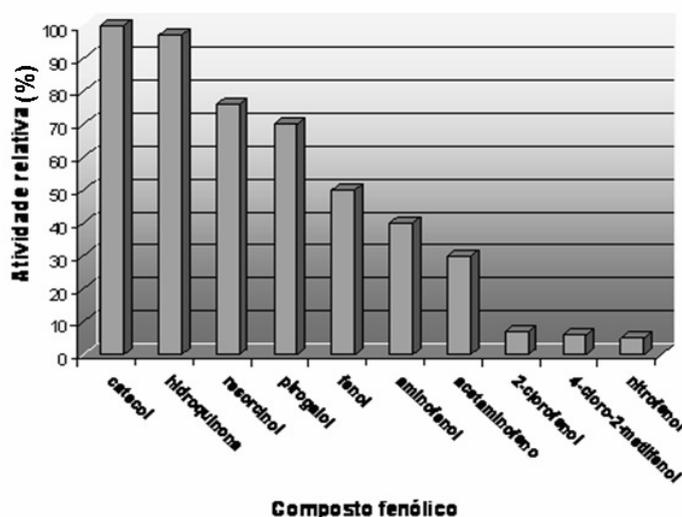


Figura 6. Respostas relativas do PCL para diferentes compostos fenólicos a 0.8 mmolL^{-1} , considerando-se pico de corrente (I_{pc}) calculado para catecol como 100%.

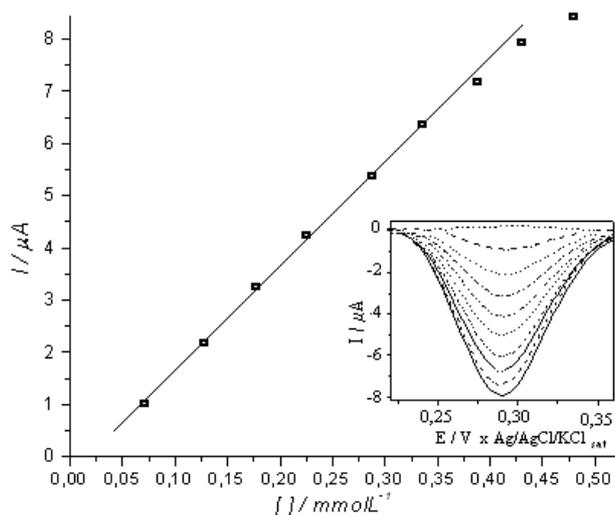


Figura 7. Curva de calibração e voltamogramas de pulso diferencial obtidos para diferentes concentrações de catecol em solução tampão fosfato 0.1 molL^{-1} pH 7.0.

Tabela 3. Estudo da adição e recuperação de catecol em águas residuárias de quatro laboratórios universitários.

Amostras	Catecol 10^{-4} mol L ⁻¹		Recuperação (%)
	Adicionado	Recuperado	
A	2.00	2,01	100,50
	5.00	5,03	100,60
	8.00	8,02	100,25
B	2.00	1,99	99,50
	5.00	4,98	99,60
	8.00	8,06	100,75
C	2.00	1,95	97,50
	5.00	5,05	101,00
	8.00	8,05	100,60
D	2.00	1,98	99,00
	5.00	4,98	99,60
	8.00	8,08	101,00

A) Instituto de Química, B) Faculdade de Farmácia, C) ICB, D) IPTESP.

Observou-se uma correlação linear com $r = 0.99897$ na faixa de concentração de 2.0×10^{-5} a 7.0×10^{-4} molL⁻¹ com limite de detecção de 4.5×10^{-6} molL⁻¹. O desempenho do PCL, se mostra condizente ao observado na literatura para outros biossensores de lacase [14-17], ressaltando-se o baixo custo de obtenção do extrato bruto e excelente estabilidade observada para enzima, com manutenção de sua atividade mesmo após longos períodos de armazenagem sob congelamento. Outrossim, quando imobilizada, o biossensor manteve até 90% de sua atividade por mais de 60 dias em refrigerador.

A Tabela 3 apresenta valores obtidos na determinação de percentual recuperado de catecol adicionado em águas residuárias de quatro laboratórios universitários. Obtiveram-se valores de recuperação entre 97.5 a 101.0% do valor adicionado, indicando a ausência de interferência positiva ou negativa deste tipo de matriz.

Ressalta-se ainda que em nenhuma das amostras detectou-se a presença de compostos fenólicos.

Conclusão

O extrato bruto de lacase obtido de cepas de *Pycnoporus sanguineus* apresentou excelente atividade enzimática em solução, bem como imobilizado em transdutores eletroquímicos de pasta de carbono. Este fato, aliado à ótima estabilidade apresentada pelo extrato bruto da enzima, torna esta espécie de fungo uma excelente alternativa para produção de lacase para fins de desenvolvimento de novos biossensores para análise ambiental.

O biossensor obtido com extrato bruto apresentou boa resposta para vários compostos fenólicos de interesse comercial e ambiental em pH neutro e em diferentes meios. O uso da voltametria de pulso diferencial em faixa de potenciais próximos de 0 V, confere boa sensibilidade e menor susceptibilidade a

interferentes potenciais, fatos que justificam a aplicabilidade do biossensor a amostras reais.

**Biossensor a Base de Extrato Bruto de Lacase (*Pycnoporus sanguineus*)
para Análise Ambiental de Compostos Fenólicos**

Referências

1. A.J. Blasco, M.C. Rogerio, M.C. Gonzalez, A. Escarpa, *Anal. Chim. Acta* 539 (2005) 237.
2. P. Janeiro, A.M.O. Brett, *Anal. Chim. Acta* 518 (2004) 109.
3. H. Hotta, M. Ueda, S. Nagano, Y. Tsujino, J. Koyama, T. Osakai, *Anal. Biochem.* 303 (2002) 66.
4. N. Duran, M.A. Rosa, A. D'annibale, L. Gianfreda, *Enz. Microb. Tech.* 31 (2002) 907.
5. R.S. Freire, N. Dúran, L.T. Kubota, *Talanta* 54 (2001) 681.
6. S.S. Rosatto, R.S. Freire, N. Durán, L. Kubota, *Quim. Nova* 24 (2001) 77.
7. M.A. Mcguirl, D.M. Dooley, *Curr. Opin. in Chem. Biol.* 3 (1999) 138.
8. P. Luis, G. Walther, H. Kellner, F. Martin, F. Buscot, *Soil Biol. & Biochem.* 36 (2004) 1025.
9. H. Claus, *Mícron.* 35 (2004) 93.
10. L. Gianfreda, F. Sannino, M.A. Rao, J.M. Bollag, *Water Res.* 37 (2003) 3205.
11. O.D. Leite, K.O. Lupetti, O. Fatibello-Filho, I.C. Vieira, A.M. Barbosa, *Talanta* 59 (2003) 889.
12. F. Daigle, F. Trudeau, G. Robinson, M.R. Smyth, D. Leech, *Biosens. & Bioelectron.* 13 (1998) 417.
13. L. Gorton, *Electroanal.* 7(1995) 23.
14. O.D. Leite, O. Fatibello-Filho, A.M. Barbosa, *J. Braz. Chem. Soc.* 14 (2003) 297.
15. J. Rogalski, A. Dawidowicz, E. Jozwik, A. Leonowicz, *J. Mol. Cat. B* 6 (1999) 29.
16. M. Portaccio, S. Di Martino, P. Maiuri, D. Durante, P. De Luca, M. Lepore, U. Bencivenga, S. Rossi, A. De Maio, D.G. Mita, *J. Mol. Cat. B* 41 (2006) 97.
17. A.J. Wilkolazka, T. Ruzgas, L. Gorton, *Enz. Microb. Tech.* 35 (2004) 238.