

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Valdinete Lins da Silva e aprovada pela comissão julgadora.

18/04/91

Graciliano Neto

CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ELETRODO  
ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE URÉIA  
UTILIZANDO CANAVALLIA MARÍTIMA

VALDINETE LINS DA SILVA

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR : PROF. DR. GRACILIANO DE OLIVEIRA NETO

CAMPINAS - 1991

BC 1105509

*A meu marido Carlos,  
companheiro dedicado,  
pelo apoio, incentivo  
e carinho.*

*Aos meus filhos, André,  
Paula e Patrícia, pela  
paciência, carinho  
e apoio.*

*Ao Prof. Dr. Graciliano O. Neto,  
pela amizade e orientação segura  
ao longo da realização deste  
trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

A' Professora Maria do Socorro Santos Ferreira, que teve participação decisiva na minha formação, pelas muitas discussões e sugestões apresentadas.

Ao amigo Roberto Matsukura, pelas valiosas sugestões e organização deste trabalho.

A' Professora Celmy Maria Bezerra de Menezes Barboza, pelo incentivo, apoio constante e sincera amizade.

Aos Professores João Pedro dos Santos Oliveira Filho, Arão Horowitz e Eleonora Pereira de Luna Freire, pelo apoio e confiança depositada.

Aos Professores Drs. Luiz Manoel Aleixo e Oswaldo Espírito Santo Godinho, pelo apoio e amizade.

Ao químico Frank Moreira Jones, pela sincera amizade.

Aos amigos do laboratório, pela alegria e amizade.

Ao Laurindo pela presteza na reprodução e encadernação da tese.

Ao Departamento de Engenharia Civil da UFPE, pelo apoio.

Ao Dr. Kurtz Rehn, do Departamento de Bioquímica da UFPE, pela doação das sementes da *Canavalia marítima*.

Aos técnicos Ronaldo Melo Fonseca e Albérico Espírito Santo, pela ajuda recebida.

A Eliete Brassoloto, pela amizade e dedicação.

Aos meus alunos, fonte de inspiração e incentivo, minha gratidão.

A UFPE e UNICAMP, pela oportunidade da realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

# ÍNDICE

Página

RESUMO

ABSTRACT

## CAPÍTULO I

### URÉIA

<u>A. INTRODUÇÃO</u> .....	01
<u>B. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE URÉIA</u> .....	02
<u>1. MÉTODO MANOMÉTRICO</u> .....	02
<u>2. MÉTODO GRAVIMÉTRICO</u> .....	03
<u>3. MÉTODO VOLUMÉTRICO</u> .....	03
<u>4. MÉTODO CROMATOGRÁFICO</u> .....	04
<u>5. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO</u> .....	05
<u>6. MÉTODO ENZIMÁTICOS</u> .....	06
<u>6.1. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO</u> .....	06
<u>6.2. MÉTODO CONDUTIMÉTRICO</u> .....	08
<u>6.3. MÉTODO POTENCIOMÉTRICO</u> .....	08
<u>C. OBJETIVO DA TESE</u> .....	09

## CAPÍTULO II

### ENZIMAS COMO REAGENTES ANALÍTICO

<u>A. INTRODUÇÃO</u> .....	10
----------------------------	----

<u>B.</u>	<u>PROPRIEDADES DAS REAÇÕES</u>	
	<u>CATALIZADAS POR ENZIMAS</u> .....	12
<u>C.</u>	<u>CINÉTICA ENZIMÁTICA DE SISTEMAS</u>	
	<u>COM UM SUBSTRATO</u> .....	12
	<u>1. SIGNIFICADO DE Km e Vmax</u> .....	18
<u>D.</u>	<u>ATIVIDADE ENZIMÁTICA</u> .....	19
<u>E.</u>	<u>FATORES QUE AFETAM AS REAÇÕES ENZIMÁTICAS</u> .....	22
	<u>1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO</u> .....	22
	<u>2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA</u> .....	23
	<u>3. EFEITO DE ATIVADORES E INIBIDORES</u> .....	24
	<u>3.1. ATIVADORES</u> .....	24
	<u>3.2. INIBIDORES</u> .....	25
	<u>4. EFEITO DA TEMPERATURA</u> .....	26
	<u>5. EFEITO DO pH</u> .....	28
	<u>6. EFEITO DO TAMPÃO E FORÇA IÔNICA</u> .....	30
	<u>7. TEMPO DE RESPOSTA</u> .....	31

### CAPÍTULO III

#### IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

<u>A.</u>	<u>INTRODUÇÃO</u> .....	32
<u>B.</u>	<u>MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO</u> .....	33
	<u>1. IMOBILIZAÇÃO POR INCLUSÃO</u> .....	33
	<u>1.1. INCLUSÃO EM MATRIZES</u>	
	<u>INSOLÚVEIS EM ÁGUA</u> .....	34

	Página
<u>1.2. MICROENCAPSULAÇÃO</u> .....	35
<u>2. ADSORÇÃO</u> .....	35
<u>3. IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO COVALENTE</u> .....	36
<u>4. IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO</u> <u>COVALENTE CRUZADA</u> .....	37
<u>C. CARACTERÍSTICAS DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS</u> .....	40
<u>D. FATORES QUE INFLUENCIAM NA IMOBILIZAÇÃO</u> <u>DAS ENZIMAS</u> .....	41

#### CAPÍTULO IV

##### PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS DA UREASE

<u>A. INTRODUÇÃO</u> .....	42
<u>B. FONTES DA UREASE</u> .....	43
<u>C. ATIVADORES E INIBIDORES DA UREASE</u> .....	44

#### CAPÍTULO V

##### ELETRODOS ENZIMÁTICOS

<u>A. INTRODUÇÃO</u> .....	46
<u>B. CARACTERÍSTICAS DOS ELETRODOS</u> .....	46
<u>1. ESTABILIDADE</u> .....	46
<u>1.1. TIPO DE IMOBILIZAÇÃO</u> .....	47
<u>1.2. QUANTIDADE E PUREZA DA ENZIMA</u> .....	47

	Página
1.3. CONDIÇÕES ÓTIMAS.....	48
1.4. ESTABILIDADE DO SENSOR BASE.....	48
2. TEMPO DE RESPOSTA.....	48
2.1. VELOCIDADE DE DIFUSÃO.....	49
2.2. CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO.....	49
2.3. CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA.....	49
2.4. pH ÓTIMO.....	50
2.5. EFEITO DA TEMPERATURA.....	50
2.6. MEMBRANA DE DIÁLISE.....	50
2.7. TEMPO DE RESPOSTA DO SENSOR BASE.....	51
3. SENSIBILIDADE.....	51

## CAPÍTULO VI

### ELETRODOS ENZIMÁTICOS PARA URÉIA

A. <u>INTRODUÇÃO</u> .....	52
B. <u>ELETRODOS COM OUTRAS FONTES DE UREASE</u> .....	58
C. <u>ELETRODOS COM CÉLULAS MICROBIOLÓGICAS</u> .....	59
D. <u>ELETRODO ENZIMÁTICO DE URÉIA EM</u> <u>ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO</u> .....	59
E. <u>MICROSSENSORES</u> .....	60

## CAPÍTULO VII

### OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA UREASE ATRAVÉS DAS FONTES VEGETAIS CANAVALIA ENSIFORMIS E CANAVALIA MARÍTIMA

	Página
A. <u>INTRODUÇÃO</u> .....	61
B. <u>PARTE EXPERIMENTAL</u> .....	61
<u>1. APARELHAGEM</u> .....	61
<u>2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA UREASE</u> .....	62
<u>2.1. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA</u> <u>DA ATIVIDADE DA UREASE</u> .....	62
<u>2.2. DETERMINAÇÃO POTENCIOMÉTRICA</u> <u>DA ATIVIDADE DA UREASE</u> .....	63
<u>2.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA</u> ....	64
<u>3. RESPOSTA DO ELETRODO COM A UREASE</u> <u>EM SUSPENSÃO</u> .....	64
<u>3.1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA UREASE</u> .....	64
<u>3.2. EFEITO DA TEMPERATURA</u> .....	65
<u>3.3. EFEITO DO pH</u> .....	65
<u>3.4. TEMPO DE RESPOSTA</u> .....	65
C. <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u> .....	66
<u>1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA</u> .....	66
<u>2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA</u> .....	72
<u>3. EFEITO DA TEMPERATURA</u> .....	73
<u>4. EFEITO DO pH E TAMPÃO NA ATIVIDADE</u> <u>ENZIMÁTICA</u> .....	74
<u>5. EFEITO DO TEMPO DE RESPOSTA</u> .....	75

## CAPITULO VIII

### CONSTRUÇÃO DO ELETRODO ENZIMÁTICO PARA UREIA, UTILIZANDO A UREASE OBTIDA DA CANAVALLIA MARÍTIMA

	Página
<u>A. INTRODUÇÃO</u> .....	76
<u>B. PARTE EXPERIMENTAL</u> .....	78
<u>1. REAGENTES E MATERIAIS</u> .....	78
<u>2. CONSTRUÇÃO DO ELETRODO ENZIMÁTICO         COM MEMBRANA DE PVC</u> .....	78
<u>3. CONSTRUÇÃO DO ELETRODO ENZIMÁTICO COM         IMOBILIZAÇÃO DA UREASE COM GLUTARALDEIDO</u> ....	79
<u>C. AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS</u> .....	80
<u>1. ESPESSURA DAS MEMBRANAS</u> .....	80
<u>2. EFEITO DA TEMPERATURA</u> .....	80
<u>3. EFEITO DO pH</u> .....	81
<u>4. TEMPO DE RESPOSTA</u> .....	81
<u>5. ESTABILIDADE OPERACIONAL</u> .....	81
<u>5.1. ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO</u> .....	81
<u>6. DETERMINAÇÃO DE Km E Vmax</u> .....	82
<u>D. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u> .....	83
<u>1. CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA</u> .....	83
<u>2. EFEITO DA TEMPERATURA</u> .....	86
<u>3. EFEITO DO pH</u> .....	89
<u>4. TEMPO DE RESPOSTA</u> .....	92
<u>5. ESTABILIDADE OPERACIONAL E AO         ARMAZENAMENTO</u> .....	95
<u>6. DETERMINAÇÃO DE Km E Vmax</u> .....	99

## CAPITULO IX

### APLICAÇÕES ANALÍTICAS DOS ELETRODOS CONSTRUIDOS

	Página
<u>A. INTRODUÇÃO</u> .....	102
<u>B. PARTE EXPERIMENTAL</u> .....	103
<u>1. REAGENTES E MATERIAIS</u> .....	103
<u>2. PROCEDIMENTO ANALÍTICO</u> .....	103
<u>2.1. CURVAS DE CALIBRAÇÃO</u> .....	103
<u>2.2. DETERMINAÇÃO DE UREIA EM AMOSTRAS</u> <u>REAIS DE SORO SANGUÍNEO</u> .....	104
<u>C. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u> .....	104
<u>D. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS DE TRABALHOS</u> <u>FUTUROS</u> .....	114
<u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	116

## RESUMO

O presente trabalho teve como propósito introduzir nova fonte de urease, para análises enzimáticas.

Foi desenvolvido um eletrodo enzimático para substrato uréia, utilizando a leguminosa "Canavalia marítima".

Os biossensores foram preparados, removendo-se a camada externa do feijão e pulverizando as sementes com um gral e com pistilo. Uma camada da "Canavalia marítima" foi imobilizada diretamente com glutaraldeído, na superfície de um sensor para gás amônia (eletrodo II), ou através de uma membrana de PVC (eletrodo I)

Pelo menos 150 análises podem ser realizadas com o eletrodo II, na faixa de concentração de  $2,5 \times 10^{-4}$  a  $9,5 \times 10^{-3}$  M, com um  $r^2$  de 0,9983.

Quando usado para determinação de uréia no sangue, o eletrodo II mostrou excelente correlação com os resultados obtidos pelo procedimento espectrofotométrico.

De um modo geral, a leguminosa "Canavalia marítima" na sua forma de pó é uma alternativa adequada para substituição da enzima isolada e purificada para finalidades analíticas, principalmente para eletrodo enzimático.

## ABSTRACT

The purpose of the work was to introduce a new source of urease, for enzymatic analysis.

Enzymes electrodes for the substrate urea, using "Canavalia maritima" bean, were developed.

The biosensors were prepared by removing the outer layer of the whole bean and pulverizing the treated seeds with a mortar and pestle. A layer of "Canavalia maritima" bean was immobilized directly, with glutaraldehyde, at the surface of an ammonia gas sensing probe (electrode II), or through a PVC membrane (electrode I)

At least 150 assays can be made with the electrode II over the range  $2,5 \times 10^{-4}$  -  $9,5 \times 10^{-3}$  M with a  $r^2$  of 0,9983.

When used for determination of urea in blood, the electrode II showed excellent correlation to results obtained by the spectrophotometric procedure.

Overall, the "Canavalia maritima" bean meal layer is a suitable alternative to isolated and purified enzyme for analytical purposes, especially for enzyme electrode.

## CAPITULO I

# URÉIA

### A- INTRODUÇÃO

A uréia ou diamina do ácido carbônico, foi descoberta por Rouelle no ano de 1773 e sua síntese foi realizada por Wöhler em 1828, a partir do Cianato de Amônio.

É um importante produto natural que constitui a etapa final do metabolismo das substâncias albuminoides ou nitrogenadas no organismo dos mamíferos e é eliminada pelos rins (25 - 40 mg diários).

A determinação de uréia, é um dos exames mais solicitados nos laboratórios de Análises Clínicas, que juntamente com a determinação de creatinina permite a avaliação da função renal.

O produto nitrogenado medido, é derivado da degradação enzimática da uréia. O aumento do nível de uréia no sangue é conhecido como Azotemia e pode ter várias causas [1,2] como : defeito na excreção renal, excessiva ingestão de produtos nitrogenados, aumento na degradação de produtos proteicos, etc.

Uma diminuição do nível de uréia pode estar associada a uma gravidez, nutrição intravenosa ou a danos no fígado.

A uréia é usada como agente desnaturante de proteína ou como fertilizante, sendo que neste último, pode haver liberação de amônia, perdendo-se nitrogênio. Esta perda, pode ser minimizada usando-se a forma uréia-aldeído, composto de condensação que diminui a perda de

nitrogênio.

Usa-se uréia, também como fonte de nitrogênio em ração para gado. No estômago dos ruminantes ela é degradada por microorganismos simbióticos.

A uréia ainda é usada em osmorregulação, através de uma dieta de peixe marinho cartilaginoso sendo acumulada nos fluidos biológicos em concentrações relativamente altas.

Vem sendo bastante utilizada, como terapêutica, por via endovenosa, para diminuir edema cerebral e combater crises agudas de hemólise nas drepanocitoses.

Cerca de 80% do nitrogênio excretado do nosso organismo está na forma de uréia.

## B- MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE URÉIA.

### 1. MÉTODO MANOMÉTRICO.

Os métodos manométricos têm sido extensivamente usados em medidas de reações que consomem ou produzem gás [3,4].

Uma detalhada discussão das técnicas manométricas podem ser encontradas nos livros de Umbreit et alii [5] e de Dixon [6].

O método manométrico descrito por Van Slyke e Hiller [7] é considerado muito preciso com erro de aproximadamente 1%, porém este não é usado para determinação de pequenas quantidades de uréia.

A técnica da microdifusão de Conway [8], com modificações introduzidas, possibilitou a medida de quantidades menores, da ordem

de 1 micrograma de nitrogênio-uréia com erro de 5%.

Estes métodos foram abandonados por serem extremamente elaborados envolvendo várias etapas.

## 2. MÉTODO GRAVIMÉTRICO

O método de Fosse et alii [9] baseia-se na reação estequiométrica da uréia com o xantidrol, posterior separação, secagem e pesagem do dixantil-uréia resultante.

Para baixos níveis de uréia, o método Fosse é mais preciso, específico e simples que o método clássico do hipobromito, de Ambard e Schmid [10], que usa a reação representada abaixo:



Originalmente desenvolvido como técnica gravimétrica, o método de Fosse foi modificado para método colorimétrico [11].

Os métodos gravimétricos são extremamente elaborados e de alto custo. Por sua precisão e exatidão, poderiam eventualmente serem usados como métodos de referência.

## 3. MÉTODO VOLUMÉTRICO.

Consiste na conversão de uréia em carbonato de amônio por meio de urease e uma avaliação antes e depois da conversão, por meio de uma titulação ácido-básica em presença de metil orange.

Este procedimento, não é diretamente aplicado para soro sanguíneo com grande teor de proteína e pequena quantidade de uréia. Contudo, quando se faz a remoção da amônia por meio de corrente de ar, como sugeriu Folin [12], pode-se obter resultados satisfatórios sem necessidade da remoção preliminar das proteínas.

É muito pouco provável que outros constituintes do sangue contribuam com amônia para o resultado final na determinação de uréia por este método.

#### 4. MÉTODO CROMATOGRÁFICO

É baseado no processo de microdifusão de Conway [8] sem necessidade de desproteinização.

Seu mecanismo específico é representado pelo esquema da Bonitz e Führ [13].

O soro se difunde por capilaridade atravessando as várias zonas do papel cromatográfico, provocando uma série de reações num determinado tempo de incubação (30' a 18-20°C), liberando amônia em concentração proporcional de uréia.

Foi usado por Parmense [14] para determinar o nível de uréia em sangue de animais como boi, cavalo, porco e carneiro.

Este método apresenta as seguintes vantagens :

- 1- Determinação quantitativa baseada numa reação específica e numa medida cromatográfica muito simples;
- 2- Utilização de uma quantidade mínima (0,2 ml) de soro ou plasma puro;

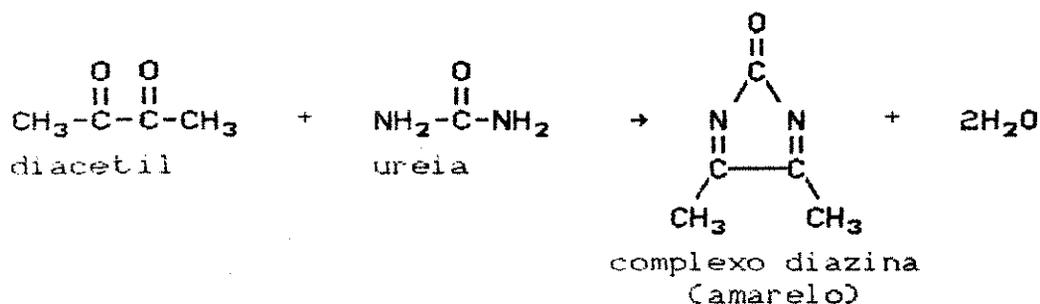
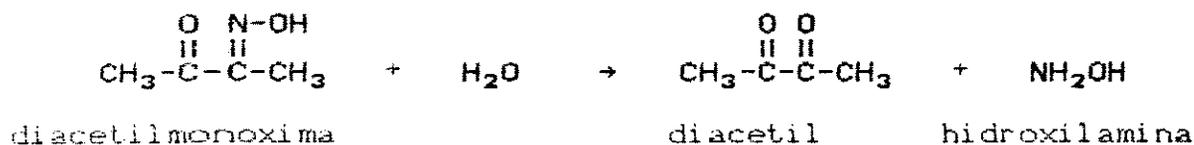
3- Dispensa a utilização de aparelhagem ou reativos especiais;

4- Estabilidade do papel cromatográfico;

5- Simplicidade e facilidade de execução.

### 5. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

É baseado na reação da uréia com a diacetilmonoxima em meio fortemente ácido. A diacetilmonoxima é convertida em diacetil, composto menos estável que reage com uréia para produzir um composto amarelo.



A reação corada descrita inicialmente por Fearon [15], apesar de bastante específica, mostrou-se inconveniente sob vários aspectos:

1- A intensificação da cor não é linear em relação a

concentração de uréia;

2- O tempo de aquecimento para desenvolvimento da cor, varia de acordo com a concentração de uréia tornando difícil estabelecer um procedimento padrão;

3- A cor é fotossensível e desaparece rapidamente;

4- Os reagentes têm odor desagradável e a reação gera vapores tóxicos e irritantes;

5- Elevado preço do diacetilmonoxima.

Numerosas variações foram propostas [16-18] com o intuito de intensificar o produto corado e minimizar o seu descoramento pela luz. A introdução de tiosemicarbazida e ions férricos ao sistema por Coulomb e Favreau [19] melhoraram bastante esta metodologia.

## 6. MÉTODOS ENZIMÁTICOS

O uso de urease, apresenta a vantagem da reação enzimática ser bastante específica e tem sido largamente empregada por Golaz [20], Manzini [21], Peters e Van Slyke [22] e Südhof e Tibchendorf [23].

### 6.1. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Este método envolve a degradação da uréia por ação da urease, formando os produtos  $\text{NH}_3$  e  $\text{CO}_2$  que podem ser quantificados pelo reagente de Nessler em Ryland [24], pela Ninhidrina em Nathan [25] ou pela reação de Berthelot [26].

Com o reagente de Nessler a amônia produzida reage com iodeto de potássio e mercúrio produzindo um composto que absorve a 460 nm. A turbidez e a baixa reprodutibilidade tornam este método pouco usado.

No procedimento desenvolvido por Chaney e Marbach [27] a amônia liberada por ação enzimática reage com fenol em presença de hipoclorito alcalino produzindo o indofenol, composto azul cuja absorção é medida a 630 nm.

Esta reação do fenol alcalino com a amônia foi descrita inicialmente por Berthelot [26] e Thomas [28] que demonstraram ser possível sua aplicação a sais de amônio. Van Slyke e Hiller [7] determinaram amônia em sangue, usando esta reação e Borsook [29] utilizou-a para determinar o teor de uréia depois da hidrólise com urease. Segundo Russel [30] a uréia deve ser calculada por reação direta em fluidos biológicos antes e depois do tratamento com urease e Fleury e Eberhard [31] seguindo esta sugestão, determinaram uréia em sangue.

Russel [30] e mais tarde Muftic [32] acharam que a reação não era específica para amônia e que aminogrupos interferiam. Longsdon [33] modificou o método, de maneira que a amônia em meio fermentado poderia ser avaliada com um auto analisador. Testando um grande número de amino ácidos, mostrou que estes não interferiam. Sua modificação consistiu na diálise removendo substâncias interferentes.

## 6.2. MÉTODO CONDUTIMÉTRICO

Baseia-se na medida do nitrogénio da uréia, utilizando-se da formação do íon amónio, durante a sua degradação pela urease. O aumento da condutividade provocado pelo aumento na concentração de íons de carga positiva é relacionado á concentração de uréia.

A primeira menção de um método condutimétrico para determinação de uréia deve-se a Hanss e Rey [34].

Os resultados são idênticos ao procedimento colorimétrico clássico, mas, com as vantagens de maior simplicidade, rapidez nas análises e sensibilidade.

## 6.3. MÉTODOS POTENCIOMÉTRICOS

A maioria dos métodos eletroquímicos para determinação de uréia, realmente combinam a especificidade da urease com a seletividade dos métodos de detecção potenciométrica. A reação da uréia catalizada pela urease produz um aumento na concentração do íon amónio e no pH que pode ser detectado por eletrodo seletivo a íon amónio [35,36], eletrodo sensível a gás amónia [37], ou eletrodo de pH [38]. Há uma relação logarítmica entre o sinal e a concentração de uréia em todos os casos [39-41].

### C. OBJETIVO DA TESE

De todos os métodos citados a determinação enzimática de uréia com urease pura é um dos exames bioquímicos mais realizados nos laboratórios de análises clínicas.

Com essa constatação em mente, objetivou-se verificar a possibilidade da utilização de uma nova fonte vegetal da enzima urease na construção de um biossensor.

Neste sentido, estudou-se a construção e aplicação de um eletrodo enzimático para uréia, utilizando a *Canavalia marítima*, fonte de urease abundante no nordeste do Brasil, acoplada a um eletrodo seletivo para amônia.

Como se trata da primeira tese, dentro do grupo de eletroanalítica da UNICAMP a utilizar enzima como reagente analítico, decidiu-se introduzir os conceitos básicos sobre a química das enzimas, nos capítulos II a VI.

Desse modo pretendeu-se atingir um outro objetivo, fornecer uma referência acessível a outros alunos de pós-graduação que decidirem, trabalhar nesta área de pesquisa.

## CAPITULO II

# ENZIMAS COMO REAGENTE ANALÍTICO

### A. INTRODUÇÃO

Enzimas são catalizadores especiais de origem biológica e existentes em todos os organismos vivos. Elas aceleram várias reações metabólicas importantes para a vida sob condições fisiológicas de pH, temperatura, etc.

Todas as enzimas, sendo proteínas, têm peso molecular da ordem de 10.000 a 2.000.000; sendo termolábeis, e extremamente sensíveis à ação do calor, desnaturando-se pela elevação da temperatura. Muitas são destruídas pela ação de temperatura superior a 50°C ou por precipitação mediante a ação de solventes orgânicos.

Como a maioria dos catalizadores, atuam no abaixamento da energia de ativação, acelerando a velocidade da reação permitindo atingir rapidamente o estado de equilíbrio sem modificá-lo. Essa energia é geralmente elevada e não compatível com as condições do meio no qual devem se desenvolver as reações metabólicas dos organismos vivos, tais como o pH próximo da neutralidade, temperatura entre 0 e 40°C, pressão próxima da pressão atmosférica, etc.

Muitas enzimas são isoladas de forma pura ou cristalina, sendo algumas provenientes até de mais de 10 fontes diferentes, como por exemplo a lactato desidrogenase.

O estudo sistemático de Enzimologia começou no século XIX com procedimentos de purificação e determinação da estrutura. Planché [43] usou extratos de plantas como catalizador biológico. Mais tarde Liebig e Wöhler [44] extraíram suco de amêndoas para catalizar a hidrólise da glicose.

As propriedades mais importantes apresentadas pelas enzimas são : especificidade e sensibilidade de suas reações.

Uma enzima é capaz de catalizar uma reação particular de um substrato mesmo que exista isômeros desse substrato e outros compostos de estrutura similar.

É esta especificidade que diferencia as enzimas de outros catalisadores inorgânicos. A sensibilidade das enzimas para reações de substratos de menores concentrações é de grande uso em análises químicas.

Há muito tempo reações catalisadas por enzimas têm sido usadas com diferentes propósitos, como a determinação de substratos, ativadores e inibidores.

Estudos intensivos têm sido realizados e hoje já se conhecem mais de 3.000 enzimas, sendo que algumas centenas delas têm sido isoladas e comercializadas de forma pura e cristalina.

Por causa de sua alta especificidade, sensibilidade [45,46] e poder catalítico, as enzimas apresentam um grande potencial de uso na química analítica. Com o desenvolvimento de técnicas instrumentais, as enzimas são largamente usadas em medicina, tecnologia de alimentos, indústrias, agricultura, estudos de meio ambiente, etc.

Cerca de 600 substâncias são determinadas por métodos enzimáticos [47-49], muitos deles apresentando resultados melhores que os métodos não enzimáticos, devido à sua excelente seletividade e sensibilidade.

Indivudualmente a análise enzimática, tem um papel importante na química analítica moderna.

## B. PROPRIEDADES DAS REAÇÕES CATALIZADAS POR ENZIMAS

O conhecimento da cinética enzimática [50-53] é importante para o entendimento do comportamento e propriedades das enzimas bem como do seu mecanismo de ação. O objetivo do estudo cinético é o de estabelecer a relação entre a velocidade da reação enzimática e a concentração do substrato e da enzima, assim como a influência de fatores como pH, temperatura, etc.

## C- CINÉTICA ENZIMÁTICA DE SISTEMAS COM UM SUBSTRATO.

Brown [50] formulou um estudo cinético para as reações enzimáticas e em 1913, uma teoria geral da ação enzimática e cinética, foi desenvolvida por Michaelis-Menten [54], e extendida mais tarde, em 1925, por Briggs e Haldane [55].

Segundo Michaelis-Menten a enzima, E, primeiro combina-se como substrato, S, para formar um complexo intermediário e transitório ES.

Este complexo resulta de uma interação de estrutura entre o

sítio ativo da enzima e a molécula do substrato (figura 1) e tende a se quebrar para formar produto P e liberar a enzima E.

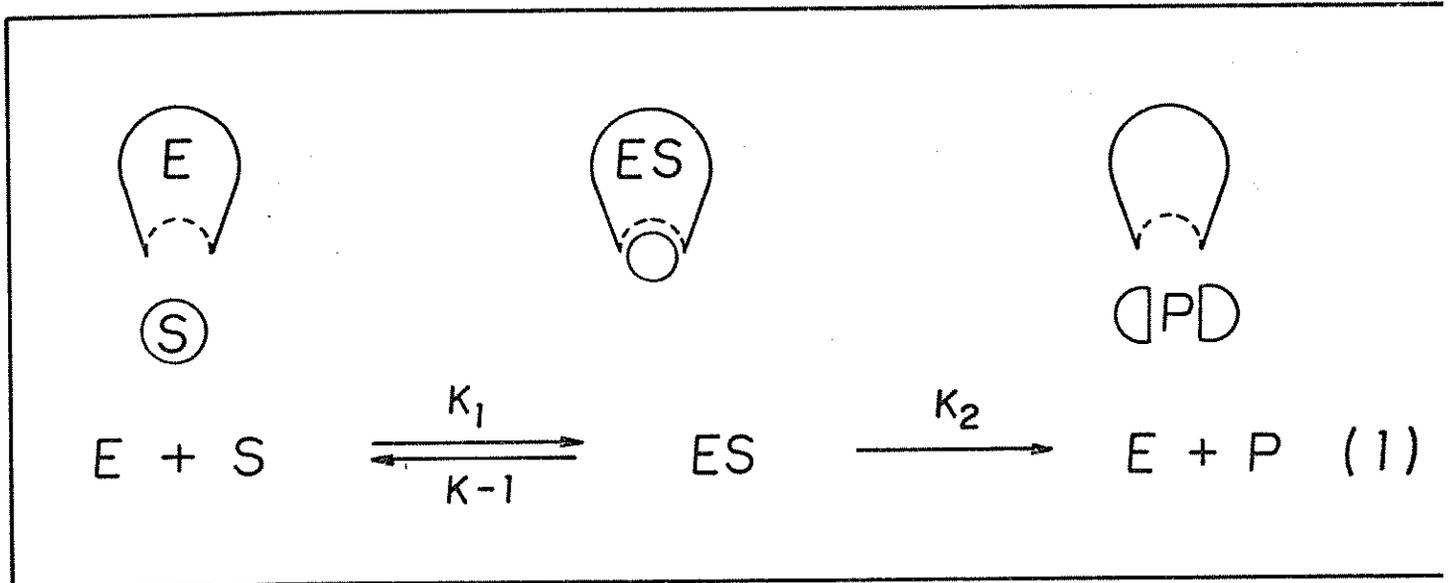


Figura 1- Complexo Enzima-Substrato

Onde :

E : Enzima

S : Substrato

ES : Complexo Enzima-substrato

P : Produto

$k_1$ ,  $k_{-1}$  e  $k_2$ : Constantes de velocidade

A velocidade de reação no tempo  $t$ , ou seja a velocidade de desaparecimento do substrato  $\left[ -\frac{dS}{dt} \right]$  ou de aparecimento do produto  $\left[ \frac{dP}{dt} \right]$  diminui em função do tempo, devido a diminuição da concentração do substrato no decorrer do desenvolvimento da reação.

A constante de equilíbrio para a formação do complexo ES é chamada constante de Michaelis-Menten,  $K_m$  e é definida como  $(k_{-1} + k_2) / k_1$ .

Briggs e Haldane [55] ampliaram a hipótese de Michaelis-Menten, postulando um estado estacionário para o qual a velocidade de formação do complexo ES é igual a velocidade de decomposição. Considerando o estado estacionário e assumindo que  $dE/dt = 0$  e  $d(ES)/dt = 0$ , temos:

$$-\frac{dS}{dt} = -k_{-1}[ES] + k_1 [E][S] \quad (2)$$

$$-\frac{dE}{dt} = -(k_{-1} + k_2) [ES] + k_1 [E][S] \quad (3)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (4)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2 [ES] \quad (5)$$

A quantidade de enzima no meio será:

$$E_t = E + ES \quad (6)$$

desde que

$$V_0 = \frac{dP}{dt} = k_2 [ES] \quad (7)$$

onde:

$V_0$  : Velocidade inicial

Dividindo ambos os lados da equação por  $E_t$

$$\frac{V_0}{E_t} = \frac{k_2 [ES]}{[E] + [ES]} \quad (8)$$

Rearranjando e substituindo ES

$$\frac{V_0}{k_2[E_t]} = \frac{\frac{k_1 [S]}{k_1 + k_2} [E]}{[E] + \frac{k_1 [S]}{k_1 + k_2} [E]} \quad (9)$$

Cancelando [E] e rearranjando, a equação de velocidade será:

$$V_0 = \frac{k_2 [E_t] [S]}{(k_{-1} + k_2)/k_1 + [S]} \quad (10)$$

Esta equação se reduz a equação de Michaelis-Menten para velocidade da reação :

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (11)$$

Onde:

$V_0$  : Velocidade inicial

[S] : Concentração inicial do substrato

$V_{max} = k_2 E_t$  é o limite máximo de velocidade observado quando toda enzima está presente como ES.

$K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$  é conhecida como constante de Michaelis e exprime a relação entre as concentrações no estado estacionário antes

do equilíbrio e possui dimensões de concentração.

Os valores das constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{max}$  podem ser obtidos de um gráfico  $v$  versus  $[S]$  mostrado na figura 2.

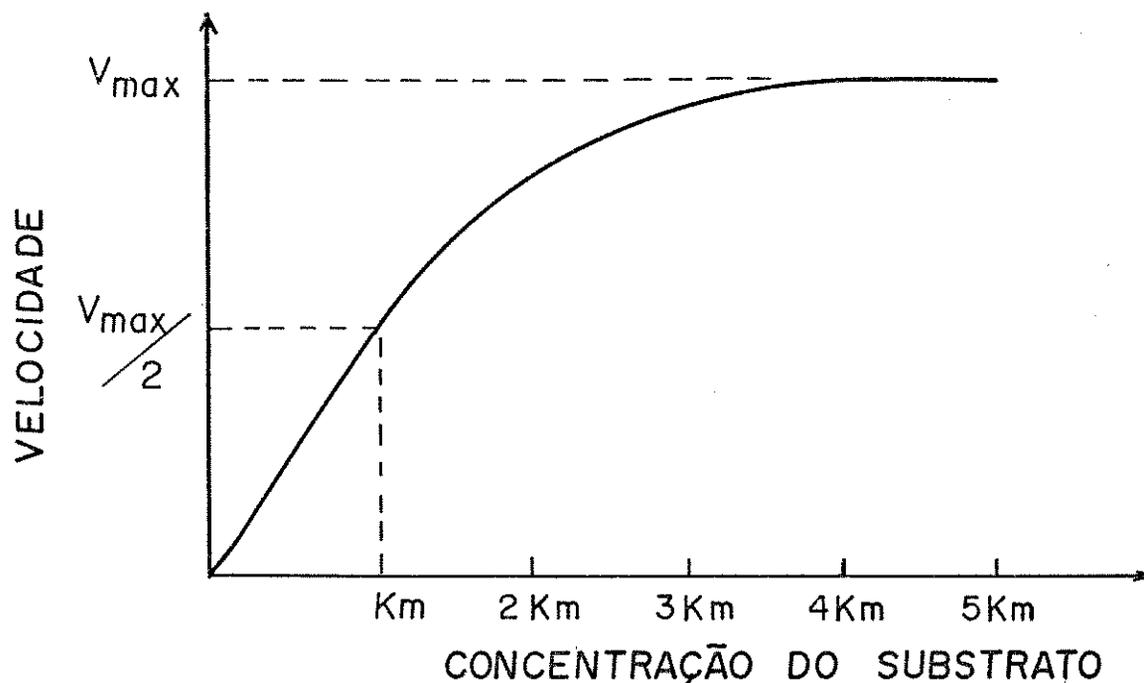


Figura 2- Efeito da concentração do substrato na velocidade inicial das reações enzimáticas.

A velocidade inicial de uma reação enzimática é então uma função da concentração da enzima e do substrato (equação 11). Fixando a concentração da enzima, a velocidade aumenta com a concentração do substrato até um limite quando o excesso de substrato é alcançado (figura 2), depois do qual a adição de mais substrato não causa aumento na velocidade.

Outras formas da equação de Michaelis-Menten são também usadas para se obter valores de  $V_{max}$  e  $K_m$ .

Considerando-se o recíproco da equação 11, têm-se:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (12)$$

Um gráfico  $1/V_o$  versus  $1/[S]$  é uma reta com coeficiente angular de  $K_m/V_{max}$  e intercepção  $1/V_{max}$  no eixo das ordenadas e  $1/V_o$  e no eixo das abcissas como mostra na figura 3.

Esta é a linearização mais comum da equação de Michaelis-Menten conhecida como equação de Lineweaver-Burk [56].

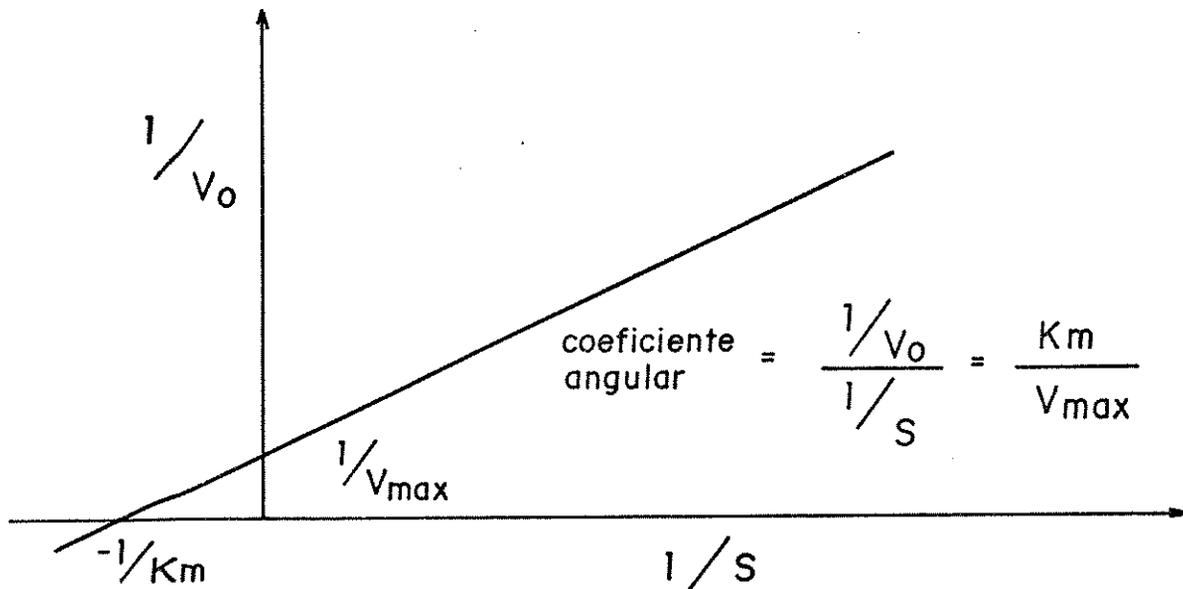


Figura 3- Linearização da equação de Michaelis-Menten, segundo Lineweaver-Burk.

Outra indicação da velocidade de uma reação enzimática será  $k_2$ , a constante para conversão do complexo enzima-substrato em produto. É linearmente relacionada a  $V_{max}$  com a concentração da enzima.

$$V_{max} = k_2 [E] \quad (13)$$

Conhecendo-se a concentração da enzima e o  $V_{max}$  pode-se calcular  $k_2$ .

### 1. SIGNIFICADO DE $K_m$ e $V_{max}$

Quando a velocidade da reação enzimática atinge o  $V_{max}$  (figura 2), toda enzima encontra-se sob a forma complexa ES.

Quando a velocidade da reação atingir a metade da velocidade máxima,  $V = V_{max}/2$ ,  $K_m$  será igual a  $[S]$ .

Se  $k_2 \gg k_{-1}$ ,  $K_m = k_2/k_1$  que é a hipótese de Michaelis-Menten, segundo qual  $[E] + [S] = [ES]$ , estão em equilíbrio e a formação do produto apresenta uma ligeira perda. Assim o valor de  $K_m$  pode ser considerado inversamente proporcional à afinidade da enzima pelo substrato. Quanto menor for  $K_m$  maior será a afinidade e vice-versa.

Quando uma enzima é imobilizada, geralmente se observa um aumento na  $K_m$ , devido provavelmente à carga no substrato e/ou suporte, efeito de difusão, mudança na configuração terciária, etc.

A constante de Michaelis-Menten sendo uma constante de

proporção do complexo enzima-substrato é um bom parâmetro quantitativo de uma reação enzimática.

#### D. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A concentração de uma enzima não é expressa classicamente em mg/l, mas em unidades de atividade, isto porque só uma pequena parte da enzima, cataliticamente ativa, está presente em uma dada massa desta substância.

Para uma dada concentração de substrato, o estudo das variações da velocidade inicial de reação em função da concentração de enzima (figura 4) mostra que essa variação não é linear.

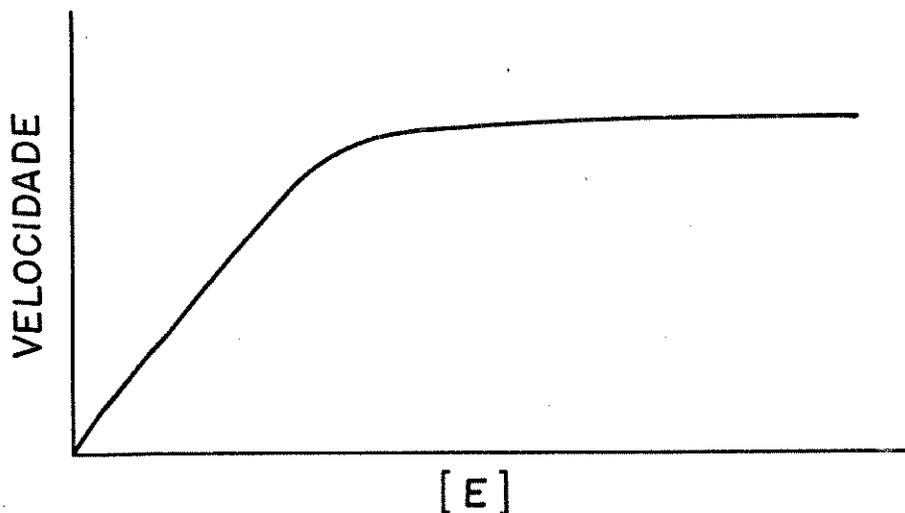


Figura 4 - Variação da velocidade inicial de uma reação enzimática com o aumento na concentração de enzima.

A velocidade inicial de uma reação enzimática é diretamente proporcional à quantidade de sítio ativo presente, quando a concentração do substrato não está em níveis de saturação e outras variáveis são otimizadas e mantidas constantes.

A saturação do substrato implica em manter o nível de substrato bastante alto, de modo que a reação é limitada apenas pela concentração da enzima. Nestas condições, a atividade enzimática pode ser estimada através do acompanhamento da velocidade da reação.

A curva apresenta uma trajetória hiperbólica que corresponde ao fato que, além de uma certa concentração de enzima, a totalidade do substrato está sob a forma de complexo enzima-substrato. Disto resultará que a velocidade inicial, função da concentração nesse complexo, permanece constante.

A atividade enzimática é função direta de sua estrutura terciária ou quaternária. Todo tratamento que modifique a conformação da enzima como aquecimento, modificação do pH, etc; dificultando ou impedindo a fixação do substrato na enzima ou ainda modificando a estrutura do sítio ativo, alterará as propriedades catalíticas da enzima e portanto seu sítio ativo.

A unidade de atividade é estabelecida através da medida da velocidade da reação a partir de uma quantidade de substrato consumido, ou produto formado, numa unidade de tempo e temperatura específica.

Grande número de definições de unidade foram usadas para várias enzimas. Em geral são designadas pelo nome do investigador que estabeleceu o procedimento, como: Karmen [57], Henry [58], Wroblewski

LaDue [59], Wacker [60], Rosalki e Wilkerson [61], Oliver [62], Rosalki [63], Bessey et alii [64], etc, gerando uma enorme confusão.

Em 1961 no 5<sup>o</sup> Congresso Internacional de Bioquímica, adotou-se a recomendação da União Internacional da Comissão Bioquímica de Enzimas, que define uma unidade de atividade (U) como a quantidade de enzima que cataliza a transformação de um micromol de substrato por minuto, ou, quando mais do que uma ligação do substrato reage, um microequivalente do grupo envolvido por minuto sob condições do experimento. Esta concentração deve ser expressa em termos de unidade internacional por litro (IU/l) ou unidade por mililitro (U/ml).

As condições experimentais tais como pH, concentração de substrato, temperatura devem ser definidas. A temperatura sempre que possível deve ser fixada em torno de 25°C.

Recomenda-se que a determinação da atividade enzimática seja feita a partir de medidas da velocidade inicial, para evitar complicações como, a formação de produtos inibidores ou reversibilidade da reação.

Outras expressões de atividade costumam também ser aceitas, assim tem-se:

1) Atividade específica; expressa como unidade de enzima por miligrama de proteína.

2) Atividade molecular; definida como unidade por micromol de enzima em concentração ótima de substrato (número de moléculas de substrato transformada por minuto por molécula de enzima).

3) Centro de atividade catalítica; definido como o número de moléculas de substrato transformada por minuto por centro catalítico

(para grupos que tenham um grupo prostético ou centro catalítico cuja concentração possa ser medida).

#### 4) Concentração em unidades por mililitros

Recentemente foi sugerido o katal como unidade de atividade enzimática, que é definida como a quantidade de enzima capaz de converter um mol de substrato por segundo.

### E. FATORES QUE AFETAM AS REAÇÕES ENZIMÁTICAS

Dentre os principais fatores que afetam a cinética das reações enzimáticas destacam-se : concentração do substrato, concentração da enzima, ativadores, inibidores, temperatura, pH, força iônica.

#### 1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

O efeito da concentração do substrato em uma reação enzimática é explicada pela equação de Michaelis-Menten, quando se plota a concentração do substrato versus sua velocidade inicial obtendo-se uma hipérbole como é mostrado na figura 2.

Para concentração de substrato muito baixa, tal como  $[S] \ll 0,1 K_m$  a constante de Michaelis-Menten se reduz a  $V_0 = (V_{max}/K_m) [S]$ .

A velocidade inicial é diretamente proporcional à concentração do substrato e se aplica a cinética de primeira ordem. Quando  $[S] \gg 10 K_m$  a equação de Michaelis-Menten se reduz a

$V_0 = V_{max}$ . A velocidade inicial depende da concentração do substrato e a cinética de ordem zero é aplicada.

Na região  $0,1 K_m \leq [S] \leq 10 K_m$  a ordem da reação é misturada. Isto é válido para reações com somente um substrato.

Frequentemente observa-se uma diminuição na velocidade da reação para concentração alta de substrato. Esta inibição não é prevista pela equação de Michaelis-Menten e pode ocorrer devido a várias causas como competição ou formação de complexos com duas ou mais moléculas de substrato combinando com um sítio ativo.

A chance de formação desses complexos aumenta com o aumento da concentração do substrato.

## 2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA

Segundo Michaelis-Menten a velocidade inicial de uma reação enzimática é proporcional a concentração da enzima de acordo com a expressão :

$$V_0 = \left( \frac{k_2 [S]}{K_m + [S]} \right) E_t \quad (14)$$

Este fato pode ser usado para determinação quantitativa da concentração de enzima. Teoricamente um aumento na velocidade de reação pode ser observado como aumento na concentração da enzima, mas esta linearidade é interrompida para concentrações altas da enzima. Isto não significa queda de atividade, mas limite no método de detecção (figura 4)

Os desvios da linearidade são provavelmente devido em

algumas medidas à presença de ativadores ou inibidores na preparação das enzimas.

### 3. EFEITO DE ATIVADORES E INIBIDORES

A velocidade de uma reação enzimática e a atividade enzimática podem ser modificados pela presença de outros compostos que não o substrato e que são denominados de ativadores e inibidores.

São compostos importantes nos fenômenos de regulação e estudo do mecanismo de ação das enzimas. Os ativadores aumentam a velocidade da reação enzimática e os inibidores a reduzem.

#### 3.1. ATIVADORES

Ativador é uma substância necessária à enzima para torná-la um catalizador, ou ainda, para aumentar o seu poder catalítico. O efeito da concentração de um ativador na velocidade inicial é similar ao da concentração do substrato.

Alguns ativadores são simples íons, como  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$ . Outros são substâncias orgânicas complexas, entre as quais frequentemente se encontram derivados de vitaminas.

Para concentrações baixas há uma dependência de velocidade de primeira ordem na concentração do ativador. Em concentrações altas, a enzima é ativada ao máximo e a velocidade independe da concentração do ativador (figura 5). O estudo da ativação enzimática tem merecido a atenção de muitos pesquisadores [65,66].



Figura 5 - Variação da velocidade inicial de uma reação enzimática com aumento da concentração de um ativador.

### 3.2. INIBIDORES

Inibição da atividade enzimática é um dos mais importantes instrumentos de regulação nas células vivas e um dos mais importantes procedimentos de diagnóstico para os enzimologistas [67,68].

Estados de inibição geralmente indicam algo em relação a especificidade de uma enzima, a arquitetura física e química do sítio ativo e o mecanismo cinético da reação. Diariamente encontramos inibidores enzimáticos simulados como drogas, antibióticos, preservativos, venenos, toxinas, etc.

O inibidor é uma substância que causa uma redução na velocidade de uma reação catalítica, ao reagir com o catalizador formando um complexo catalizador-inibidor ou reagindo com um dos reagentes.

As enzimas são muito sensíveis a traços de metais e a inibição de reações enzimáticas tem sido usada para determinação do metal inibidor [69,70].

#### 4. EFEITO DA TEMPERATURA

A reação enzimática consiste de três sucessivos passos: a formação do complexo enzima-substrato, conversão deste num complexo produto-enzima e a dissociação em produto e enzima livre. O efeito total da temperatura na reação resultará da separação desses passos individuais (figura 6).

O aquecimento, a energia livre, a entropia dos processos contribuirão para os parâmetros termodinâmicos observados. Para cada enzima existe uma temperatura ótima, para um determinado conjunto de condições experimentais. A velocidade de cada reação química aumenta à medida que se eleva a temperatura da reação.

Este aumento leva a um aumento da agitação das moléculas e da frequência de colisão entre as moléculas do substrato e da enzima, acarretando um aumento na velocidade de desnaturação. Esta, modifica a estrutura terciária e quaternária da proteína, desativando a enzima. De fato na desnaturação das enzimas pelo calor deve-se considerar o binômio tempo-temperatura, ou seja duração e intensidade do tratamento

térmico.

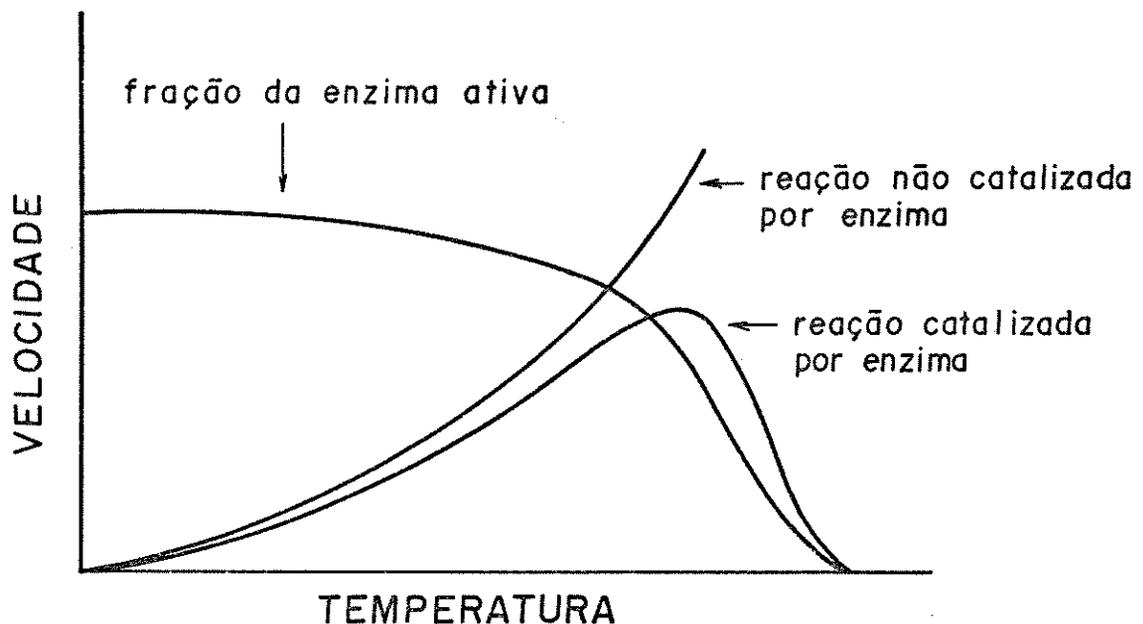


Figura 6 - Efeito da temperatura na velocidade de reação.

Para temperaturas baixas, que geralmente não têm efeito desnaturante, a repetição das transições sólido-líquido (congelamento-descongelamento), provoca notáveis perdas de atividade. Para evitar grandes perdas de atividade as enzimas são guardadas sob refrigeração entre 2 a 5°C. A temperatura recomendada pela IUPAC-IUB para desenvolvimento das reações enzimáticas é de 25°C. No entanto em alguns países devido às suas condições climáticas, adota-se a temperatura 30 - 37°C.

## S. EFEITO DO pH

As enzimas apresentam pH ótimo, no qual têm atividade máxima. Acima e abaixo deste pH, a atividade decresce, resultando na formação de uma forma iônica imprópria do substrato ou da enzima, ou de ambos, na desnaturação da enzima ou na combinação desses efeitos.

O pH ótimo de uma enzima é determinado experimentalmente para cada condição de trabalho. Assim por exemplo, a figura 7 mostra a atividade da urease a vários pHs.

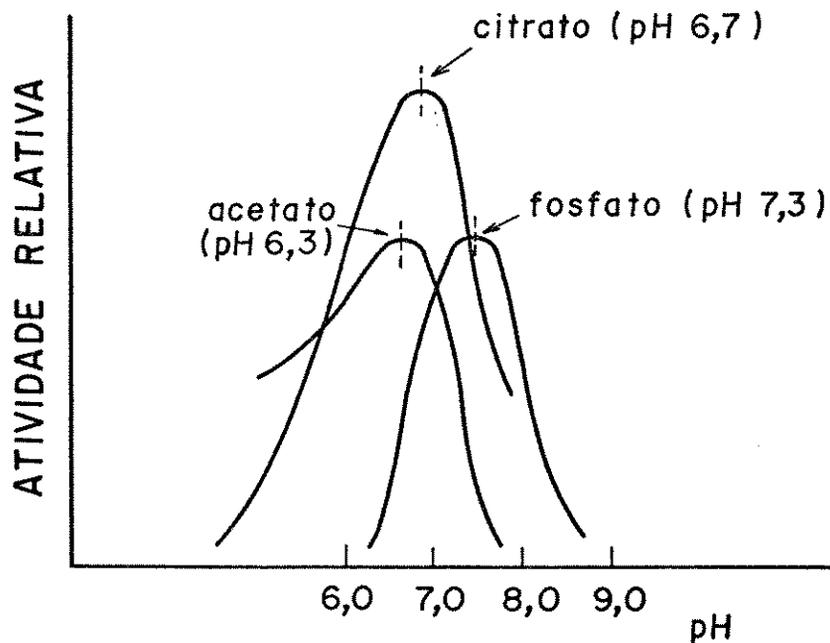


Figura 7 - Curva de atividade da urease em função do pH.

Os sítios ativos das enzimas são geralmente compostos por grupos ionizáveis, que devem estar na forma iônica apropriada afim de manter a sua conformação. Dentre os resíduos de aminoácidos da molécula enzimática que possuem grupos ionizáveis, alguns vão se ligar ao substrato, outros vão participar da reação e a maioria vai servir para manter a conformação da enzima. Esses resíduos, assim como o substrato em muitos casos são sensíveis ao pH e possuem estados ionizáveis diferentes.

É fácil compreender que quando um grupo  $-COO^-$  do sítio ativo é necessário à fixação do substrato, a diminuição do pH do meio acarreta sua transformação em  $-COOH$ , não permitindo mais a imobilização do substrato, suprimindo a atividade da enzima.

A forma da curva de pH depende de vários fatores distintos. A enzima só pode catalizar a reação se o substrato estiver na forma apropriada de ionização e isto depende do pH do sistema de reação e do pK do grupo ácido ou básico que se ioniza. A atividade da enzima também é afetada pelo grau de dissociação de certos aminoácidos da cadeia proteica, uma vez que o pH e o ambiente iônico afetam a estrutura tridimensional.

Quando se efetua uma reação catalizada enzimaticamente em diferentes valores de pH mantendo constantes as concentrações de enzima e do substrato, há intervalos de pH em que não ocorre reação ou onde a velocidade de reação é muito lenta.

O declínio da atividade enzimática resulta na formação de uma forma iônica imprópria do substrato ou da enzima, ou ambas, ou desnaturação, ou ainda a combinação desses efeitos.

A natureza do tampão tem um papel importante na imobilização das enzimas, como por exemplo: uma imobilização com glutaraldeído via ligação covalente será melhor realizada em tampão fosfato, que Tris-HCl, onde ocorre a ligação cruzada com grupos  $\text{NH}_2$  do tampão.

## 6. EFEITO DO TAMPÃO E FORÇA IÔNICA

A força iônica também afetará a reação enzimática por mudança no equilíbrio da reação. Pode ocorrer de o eletrodo enzimático não responder bem no pH de uma reação enzimática. Neste caso deve haver um compromisso entre sensor e reação enzimática.

A atividade de um sistema enzimático, depende não só do pH, mas também do tipo do tampão e força iônica. O tampão pode não só afetar a atividade, mas também a estabilidade de uma enzima devido à carga, ativação aniônica, mudanças na superfície, termodinâmica da reação, etc.

Para encontrar resultados reprodutíveis deve-se eliminar cuidadosamente ions estranhos e controlar a força iônica, para se assegurar a concentração efetiva dos reagentes.

## 7. TEMPO DE RESPOSTA

De modo geral, o comportamento de um eletrodo pode ser interpretado com base no mecanismo de resposta. O limite de detecção e a resposta em função do pH são essencialmente determinados pelo desempenho do sensor propriamente dito. É evidente que uma diminuição

na espessura da membrana reduz o tempo de difusão do substrato e do produto da reação através da mesma. Um aumento na temperatura e na alcalinidade do meio também resulta em um menor tempo de resposta, mas leva a desnaturação da enzima mais rapidamente.

Existem algumas resistências a difusão do produto formado ( $\text{NH}_3$ ) do seio da solução até a superfície de catálise, e daí através da membrana semipermeável do eletrodo de amônia. É claro que a transformação do substrato somente ocorre após ter alcançado a superfície enzimática. Pode-se acelerar este processo de difusão aumentando-se a agitação da solução.

Outras resistências difusionais internas podem surgir devido à movimentação do substrato no interior do meio catalítico poroso, o que aumentará o tempo de resposta.

### CAPÍTULO III

## IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

### A. INTRODUÇÃO

O uso de enzimas com propósitos analíticos tem sido limitado por causa de certas desvantagens como: altos custos para extração e purificação das macromoléculas enzimáticas, instabilidade em solução, baixa precisão e sua não recuperação.

A imobilização sobre suporte insolúvel leva a um aumento na estabilidade enzimática facilitando o uso em reatores contínuos, permitindo preparações mais puras e melhorando a qualidade dos produtos obtidos.

Em 1916, Nelson e Griffin [71] mostraram que a invertase adsorvida em carvão, conserva sua atividade catalítica, podendo ser reutilizada várias vezes. Já em 1971, Grubhofer e Schleith [72] apresentaram as primeiras técnicas de imobilização sobre derivados de poliaminoestireno.

Apartir de 1960, as pesquisas foram intensificadas com o impulso dado pelas equipes do professor Katchalski [73] em Israel e Manecke [74] na Alemanha. Chibata [75] e colaboradores, prepararam o primeiro reator com enzima imobilizada. Em vários outros países, esta área tem recebido atenção dos pesquisadores como na França, Duran e Monsan [76] no Instituto Nacional de Ciências Aplicadas Toulouse.

Vários livros e revisões já foram publicados sobre técnicas de imobilização e o uso de enzimas imobilizadas em química analítica [77,78], química clínica [79] e em colunas [80].

## B. MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Os métodos de imobilização devem ser brandos e em condições bem controladas, respeitando a estrutura nativa das proteínas.

Em 1971, a primeira conferência de Engenharia Enzimática de Henniker (USA) definia uma classificação de enzimas imobilizadas considerando-as como um caso particular de enzimas modificadas. De um modo geral a imobilização das enzimas, oferece vantagens em relação a enzima solúvel, tais como:

1) Reutilização: a enzima pode ser usada muitas vezes, diminuindo o custo por análise;

2) Maior estabilidade: quando imobilizadas as enzimas são mantidas num ambiente mais semelhante ao que são encontradas na natureza;

3) Poucas interferências: menos susceptíveis aos ativadores e inibidores normais.

### 1. IMOBILIZAÇÃO POR OCLUSÃO

Neste processo, as moléculas das enzimas ficam aprisionadas dentro da rede tridimensional de um polímero insolúvel na água ou aprisionadas dentro de microcápsulas delimitadas por uma membrana

semipermeável cujos poros são pequenos para impedir a difusão de macromoléculas, mas suficientemente largos para permitir a passagem do substrato e dos produtos da reação.

### 1.1. OCLUSÃO EM MATRIZES INSOLÚVEIS EM ÁGUA

Neste caso a enzima é dissolvida e dispersada numa solução de um monômero, polimerizada na presença de um agente de reticulação e de um coloide protetor como albumina, agarose ou dextrana, ou ainda a enzima pode ser aprisionada dentro de fibras ocas.

Os polímeros mais usados são a poliacrilamida, metacrilato, polietileno glicol, amido, K-carragena, etc.

Guilbault e Das [40] estudaram vários fatores que afetam a imobilização da urease em gel de poliacrilamida e borracha de silicone, constatando uma perda de enzima durante a polimerização, de cerca de 20 à 25 %.

A imobilização em Cloreto de Polivinila (PVC) consiste na incorporação da enzima dentro da matriz PVC. As membranas obtidas apresentam boas características mecânicas, físicas, tempo de vida prolongado, seletividade, etc.

Solventes apropriados são usados com PVC e a solução do polímero é misturada com a enzima, formando um filme, quando o solvente é evaporado à temperatura ambiente.

Alguns plastificantes são usados com o propósito de tornar o polímero mais plástico à temperatura ambiente. A principal vantagem deste tipo de imobilização é o não envolvimento dos grupamentos ativos

das enzimas e com a totalidade da massa proteica mantida dentro da rede do polímero. A desvantagem é que muitas vezes as condições de polimerização leva á desnaturação, além de fenômenos de impedimento estérico e difusão através do gel ou membrana.

### 1.2. MICROENCAPSULAÇÃO

É uma técnica introduzida há alguns anos por Chang [81] bastante usada nas indústrias de cosmético ou de corantes e na indústria alimentícia. Consiste em ter a enzima dentro de uma cápsula delimitada por uma membrana semipermeável.

Uma solução aquosa da enzima e um monômero hidrofílico (poliamida ou glicol) são misturados com um solvente orgânico insolúvel em água. A adição de um segundo monômero hidrofóbico (cloreto de ácido polibásico por exemplo) provoca uma reação de polimerização levando á formação de uma membrana ao redor das microgotículas. Esta técnica não tem sido usada para preparação de eletrodos enzimáticos.

### 2. ADSORÇÃO

Neste processo estão envolvidos forças de interação de baixa energia entre o suporte e a proteína tais como: interação de Van der Waals, ligações hidrogeniônicas ou ligações hidrofóbicas. Com suportes não porosos, as enzimas ficam fracamente ligadas, enquanto que, com suportes porosos as macromoléculas protéicas preenchem seus

poros.

Diferentes parâmetros influem na quantidade da enzima fixada e nas ligações criadas, destacando-se concentração da proteína enzimática, pH, força iônica do meio, temperatura, formato das partículas e natureza do suporte [82,83].

Alguns trabalhos visando adsorção de proteínas foram revistos por Schuan e Katchalski [84]. Suportes ricos em sítios hidrófilos são mais adsorventes que os suportes hidrófobos e fornecem sistemas mais estáveis.

Entre os adsorventes mais usados têm-se: quartzo [82], vidro [83], carvão [85], sílica gel [86], alumina [87], resina trocadora de ions [88], e bentonita [89].

A maior vantagem deste método reside na extrema simplicidade e no emprego de condições brandas, que preservam a atividade das enzimas.

A principal desvantagem é que as forças de interação envolvidas são relativamente fracas e frequentemente conduzem, no decorrer do tempo, a uma dessorção progressiva das enzimas. Este inconveniente limita o emprego desse processo às preparações enzimáticas mais baratas.

### 3. IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO COVALENTE

Este método, envolve a formação de ligação química entre a molécula enzimática e os grupos reativos do suporte, além de fenômenos de adsorção eletrostáticos que consolidam a fixação.

Para evitar a desnaturação das enzimas é necessário proceder uma ativação prévia dos grupos funcionais do suporte, possíveis de participar da reação, a tabela I mostra os principais grupos funcionais de matrizes.

Tabela I- Grupamentos funcionais das enzimas que participam dos processos de imobilização sobre suporte.

grupo amino grupo carboxílico grupo tiol hidroxila fenólica grupo imidazol grupo hidroxila	$\alpha$ e $\beta$ amino grupo $\beta$ e $\gamma$ grupo carboxílico SH cisteína tirosina histidina serina
---	--

Os suportes são escolhidos por suas propriedades de solubilidade, grupos funcionais, estabilidade mecânica, área superficial, natureza hidrofóbica e hidrofílica.

Na tabela II encontram-se alguns suportes usados na imobilização por ligação covalente.

Tabela II- Suportes usados para ligação covalente.

Suporte	Referência
vidro poroso	90,91
Poliacrilamida	92,93
derivados do ácido poliacrílico	94,95
ácido poliaspártico	96
ácido glutâmico	94
poliestireno	97
nylon	98,99
celulose	100,101
sefadex	102,103
agarose	104,105
carboximetilcelulose	96,100

Entre as vantagens deste método, incluem-se: simplicidade e solidez do vínculo proteína suporte, menores quantidades de enzimas, em relação ao método de oclusão ou adsorção, e portanto, uma técnica indicada no caso de enzimas de preço elevado.

O inconveniente principal do processo está nos riscos de inativação parcial ou total da enzima no decorrer da reação de fixação. Além do mais, os suportes orgânicos são susceptíveis de serem atraídos por microorganismos e são sensíveis às condições do

meio : variações do pH e emprego de certos solventes.

#### 4. IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA

Nesta técnica, as moléculas das enzimas ligam-se entre si por pontes intermoleculares, utilizando agentes bi ou multifuncionais, obtendo-se desta forma, estruturas de peso molecular alto [106,107].

Alguns destes reagentes são o glutaraldeído [108], ácido bisdiazobenzidina -2 -2- dissulfônico [109], ácido difenil-4 -4-ditioacetato -2 -2- dissulfônico [110], 1,5- difluoro-2 -4-dinitrobenzeno [111], tolueno- 2-isocianato- 4-isotiocianato [112], etc.

Dentre os reagentes polifuncionais, o glutaraldeído é um dos mais utilizados para imobilização covalente cruzada. Esquematicamente a reação entre o glutaraldeído e a enzima está representado na figura 8.

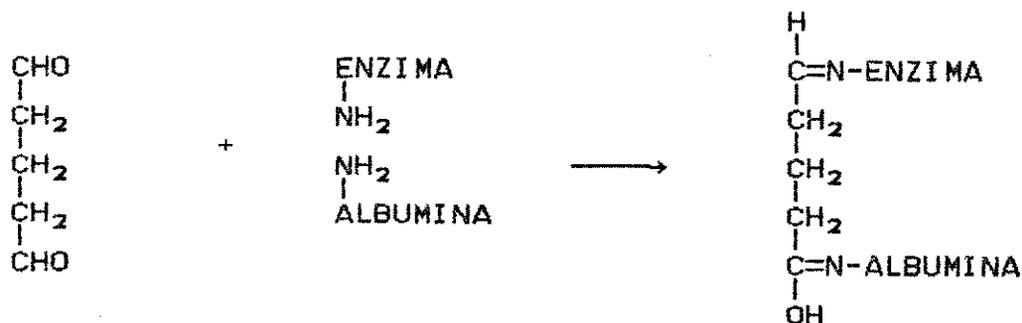


Figura 8 - Reação esquemática entre o glutaraldeído e a enzima.

As estruturas assim preparadas podem ser incluídas em um gel. As vezes há uma diminuição na atividade da enzima, devido ao estabelecimento de interações entre macromoléculas em razão de sua proximidade espacial.

Para remediar esse inconveniente é possível dispersar a enzima por meio de moléculas proteicas não ativas como albumina, fibrinogênio ou hemoglobina que evitam o contato muito estreito entre as moléculas do biocatalizador.

Esta técnica proporciona complexos de alta atividade e grande resistência à desnaturação que é explicada por fenômenos de impedimento estérico. A maior desvantagem é que muitas enzimas são sensíveis à reação e perdem atividade.

### C. CARACTERÍSTICAS DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS

Quando uma enzima é imobilizada, algumas de suas características podem se alterar:

1) pH ótimo - devido a modificação do microambiente, pH local, interações eletrostáticas, etc. O pH ótimo para a atividade enzimática pode sofrer alteração de mais ou menos uma unidade.

2) Alteração na constante de Michaelis-Menten há geralmente um aumento de  $K_m$  devido ao efeito de difusão, modificação na estrutura tridimensional, etc.

3) Maior estabilidade - A velocidade de desnaturação de uma enzima imobilizada é menor que a enzima livre, pois ela está protegida como se estivesse no seu ambiente natural.

Estas novas características conferem vantagens às enzimas imobilizadas em relação às solúveis como: baixo custo por análise, reutilização, eficiência em reações com múltiplas etapas, maior reprodutibilidade e precisão.

#### D. FATORES QUE INFLUENCIAM NA IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS

Como a relação custo/benefício é importante na implantação de qualquer metodologia analítica, a utilização das enzimas na rotina laboratorial só foi possível com o advento das técnicas de imobilização que permitiram a reutilização destes catalizadores biológicos.

Existe portanto um incentivo para a conversão de uma enzima solúvel em imobilizada. O custo de uma enzima depende muito da sua obtenção e o custo de sua imobilização refere-se ao trabalho e custo químico, complexidade do método, etc (tabela III).

Tabela III- Fatores que afetam o custo de um processo de imobilização de enzimas

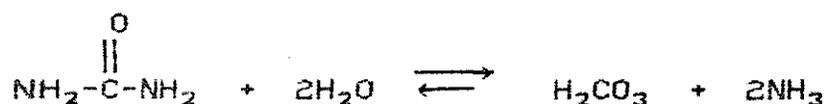
Atividade específica	Processo de imobilização e quantidade de enzima
Estabilidade catalítica	Estabilidade a estocagem; Estabilidade operacional
Regeneração da capacidade de catálise	Capacidade de regeneração da atividade; Capacidade de reuso do suporte

## CAPÍTULO IV

### PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS DA UREASE

#### A. INTRODUÇÃO

Urease (ureia amidohidrolase E.C.3.5.1.5) foi a primeira enzima a ser isolada na forma pura por Sumner [113] em 1926. É uma enzima de alto poder catalítico que cataliza a hidrólise da ureia em  $\text{CO}_2$  e  $\text{NH}_3$ , segundo a equação abaixo:



Encontra-se principalmente em sementes de plantas, microorganismos e animais invertebrados como caranguejos, mexilhões, etc. Demonstra um alto grau de especificidade para uréia e derivados como hidroxí e dihidroxíuréia.

A urease de soja, apresenta pH ótimo 7,0 e peso molecular 480.000, consiste de duas moléculas enzimaticamente ativas de peso molecular 240.000.

Em solução neutra e na presença de dodecil sulfato de sódio 1% ela se dissocia em 8 unidades (PM 60.000) que compreende duas cadeias ligadas covalentemente (cada cadeia de PM 30.000). A urease é resistente a desnaturação pelo seu próprio substrato, o qual numa concentração 8M é capaz de desnaturar numerosas proteínas.

Em concentração de uréia 8 à 9M a urease se dissocia em

subunidades (PM 60.000) que ainda possuem atividade.

## B. FONTES DE UREASE

Foi Marshal [114] em 1913 quem primeiro utilizou urease, extraída do "jack bean" para dosar ureia de amostras de sangue e urina, seguindo um processo de aeração para o recolhimento e titulação da amônia resultante.

Em 1909, já se havia demonstrado a presença de urease na soja (soja *hispida*). Em 1937, Damodaran e Sivamakrishnam [115] fizeram extensivo estudo dos teores de urease em várias sementes nativas na Índia especialmente Papilionaceae e Cucurbitaceae.

Machado [116], realizando estudos concluiu que as melhores fontes de urease no Brasil são:

- a) Semente de melancia (*Citrullus vulgaris*)
- b) Feijão-de-soja (*Soja hispida*)
- c) Feijão de porco ou "jack bean" (*Canavalia ensiformis*)
- d) Abóbora moganga (*Cucurbita maxima*)

Esta última apresenta a desvantagem de seus extratos desenvolverem rapidamente elevados teores de amônia, provavelmente devido a outros sistemas enzimáticos (canavanase, arginase, etc).

### C. ATIVADORES E INIBIDORES DA UREASE

No caso da urease Kistaiakowsky e Shaw [117] estudaram a sua inibição pelos metais Ag (I), Hg (II), Cu (II), Cd (II), Co (II), Ni (II), Mn (II), Pb (II).

Gorin [118] e seus colaboradores publicaram um artigo afirmando que os sítios ativos da urease são grupos sulfidrila. Ions metálicos geralmente inativam a urease por reação com grupo sulfidrila e a correlação que a toxicidade de cada um desses ions tem com o produto de solubilidade do sulfeto do metal correspondente.

Sidney e Joseph [119] estudando a determinação potenciométrica direta do sistema ureia-urease sob condições experimentais controladas de efeito de pH, temperatura, concentração da enzima, concentração do substrato, inibidores e ativadores concluíram que cobre e zinco desativam a urease numa inibição não competitiva sendo o primeiro mais forte, devido ao menor valor do produto de solubilidade do sulfeto de cobre.

A inibição da urease pelo Cu (II), foi estudado por Bahabur e Chandra [120] em 1962, mas Leuthardt e Kohler [121] concluíram que o cobre não afeta a urease na ausência de ácido  $\bar{a}$ scórbico.

Pitner [122] atribuiu a inibição da urease por metais devido a ligações químicas destes com os sítios ativos da enzima. A amônia forma complexos com metais Hg, Ag, Cu, Au, Ni, Co, Cd e Zn. Muitos podem ser removidos como hidróxidos complexos ou precipitados em solução básica. Quando hidróxido está presente em concentração igual a 0,1 M e a concentração de amônia é menor que  $10^{-3}$  M, só Hg formará

complexo com a amônia. Neste caso iodeto é recomendado para evitar interferência porque forma complexo de Hg solúvel em qualquer pH.

A complexação destes metais por um agente quelante, como cianeto, EDTA, etc. pode eliminar suas interferências. A inibição da urease por metais é do tipo não competitiva a pH 8,9; a velocidade da reação enzimática é inversamente proporcional a concentração do inibidor.

A atividade das enzimas imobilizadas têm sido restaurada quando tratadas com soluções de tioacetamida, EDTA, tampão Tris, etc.

A inibição competitiva da urease por nitrato é pequena, provavelmente este íon não afeta a atividade da enzima a pH 7,0.

A ativação da urease pelo fosfato ( $\text{HPO}_4^{-2}$ ) foi observada por Fasman e Nieman [123]. É possível que carbamil fosfato seja um produto intermediário no mecanismo da reação.

## CAPITULO V

# ELETRODOS ENZIMATICOS

### A. INTRODUÇÃO

O progresso da potenciometria com eletrodo seletivo e eletrodos voltamétricos tem sido expressivo, em diagnósticos laboratoriais, terapia intensiva e pesquisas biológicas. Isto fica evidenciado pela expansão desse assunto na literatura [41,42,70,76,124].

A idéia inicial de usar uma enzima aliada a um eletrodo é atribuída a Clark e Lyon [125], mas a denominação de "Eletrodo Enzimático" se deve a Updike e Hicks [126].

### B. CARACTERÍSTICAS DOS ELETRODOS

As características mais importantes de um eletrodo enzimático são: estabilidade, tempo de resposta e sensibilidade.

#### 1. ESTABILIDADE

A estabilidade de um eletrodo enzimático pode ser afetada por vários fatores:

- 1) Tipo de imobilização
  - a) solúvel + membrana de diálise
  - b) Física

c) Química

2) Quantidade e pureza da enzima

3) Condições ótimas

4) Estabilidade do sensor base

### 1.1. TIPO DE IMOBILIZAÇÃO

O tipo de imobilização afeta consideravelmente a estabilidade do biossensor. Geralmente, um eletrodo com enzima solúvel é usado por cerca de uma semana com 25 à 50 determinações, sendo o eletrodo guardado sob refrigeração quando fora de uso.

Os eletrodos com enzimas imobilizadas fisicamente são estáveis por mais tempo chegando algumas vezes a 3 semanas ou mais, e cerca de 100 amostras, dependendo do grau de cuidado na preparação do polímero.

Os eletrodos com enzimas imobilizadas por métodos químicos apresentam-se mais estáveis com vida útil maior, devido às ligações mais efetivas entre as enzimas e os suportes diminuindo a lixiviação da camada enzimática

### 1.2. QUANTIDADE E PUREZA DA ENZIMA

A estabilidade aumenta com a espessura da camada enzimática, porém o tempo de resposta também aumenta. Há uma quantidade crítica de enzima necessária para se obter uma resposta nerstiana. Muitas vezes é vantajoso adicionar mais enzima, principalmente quando ela não

é purificada.

### 1.3. CONDIÇÕES ÓTIMAS

As condições operacionais ótimas como pH, temperatura, concentração de enzima, concentração do substrato, etc, são determinadas experimentalmente.

### 1.4. ESTABILIDADE DO SENSOR BASE

A estabilidade do eletrodo enzimático depende do sensor base. Em muitos casos esse não é o fator mais importante quando o sensor tem uma estabilidade maior do que a enzima, porém isto deve ser considerado quando se usa eletrodos com tempo de vida curto, como por exemplo os de membrana líquida.

## 2. TEMPO DE RESPOSTA

O tempo de resposta do sensor envolve a difusão do substrato através da membrana enzimática e a difusão do produto formado até a superfície do sensor base quando é então monitorado.

Alguns fatores que afetam o tempo de resposta são:

- 1) Velocidade de agitação
- 2) Concentração do substrato
- 3) Concentração da enzima
- 4) pH ótimo
- 5) Temperatura

6) Membrana de diálise

7) Tempo de resposta do sensor base

### 2.1. VELOCIDADE DE AGITAÇÃO

A velocidade de difusão do substrato depende da agitação da solução, que afeta a resposta do eletrodo, o valor do potencial, a velocidade de transferência de massa do substrato para o eletrodo, assim como a velocidade de transferência de massa do produto para fora do eletrodo.

Agitação mais elevada fornece potenciais mais reprodutíveis e menor tempo de resposta.

### 2.2. CONCENTRAÇÃO DO SUSTRATO

A velocidade da reação aumenta com o aumento da concentração do substrato diminuindo o tempo de resposta, de acordo com previsto pelo modelo de Michaelis-Menten.

### 2.3. CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA

Um aumento na quantidade de enzima pode levar a um tempo de resposta mais longo. Isto é devido ao aumento na espessura da membrana, dificultando a difusão do substrato na mesma. Para bons resultados recomenda-se a utilização de enzimas com alta atividade, permitindo obtenção das membranas com a enzima imobilizada, as mais finas possíveis.

#### 2.4. pH ÓTIMO

Como já foi dito anteriormente cada enzima tem um pH ótimo, no qual ela é mais ativa, e uma faixa de pH onde existe uma certa reatividade. O pH ótimo de uma enzima imobilizada pode não ser o mesmo de uma enzima solúvel. Recomenda-se geralmente ajustar o pH atendendo às necessidades da enzima e não às do eletrodo base.

#### 2.5. EFEITO DA TEMPERATURA

Pode-se prever um duplo efeito com o aumento da temperatura: aumento na velocidade da reação enzimática resultando num tempo de resposta mais rápido, e uma mudança no potencial de equilíbrio em virtude do coeficiente de temperatura na equação de Nernst e Van't Hoff.

#### 2.6. MEMBRANA DE DIÁLISE

Em muitos casos é vantajoso usar as membranas de diálise que servem para proteger as enzimas e prolongar a vida útil do biossensor. Estudando o efeito da espessura das membranas de diálise Guilbault e Montalvo [127] notaram que a membrana de celofane era a que influiu menos no tempo de resposta para eletrodo de uréia.

O tempo de resposta e equilíbrio da reação podem ser alteradas pela variação da espessura da membrana de diálise.

### 2.7. TEMPO DE RESPOSTA DO SENSOR BASE

O tempo de resposta de um eletrodo depende do sensor base.

No caso do eletrodo de amônia depende da concentração, levando-se até 15 minutos para concentrações mais diluídas.

### 3. SENSIBILIDADE

A sensibilidade de um eletrodo enzimático depende diretamente da sensibilidade do sensor base.

Para o eletrodo sensível a amônia chega-se a detectar até 20 ppb nas condições ótimas de temperatura e pressão.

## CAPÍTULO VI

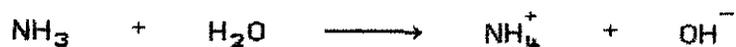
# ELETRODOS ENZIMÁTICOS PARA UREIA

### A. INTRODUÇÃO

Eletrodos sensíveis à amônia empregados para determinação de ureia usam membranas permeáveis à gás para separar as amostras da solução de referência interna. Estas membranas evitam que espécies iônicas entrem na solução de referências interna eliminando alguma interferências devido a ions dissolvidos. Concentrações iônicas podem afetar a solubilidade da amônia devendo ser removidos da solução.

A amônia dissolvida em solução da amostra se difunde através da membrana até que a pressão parcial da amônia seja a mesma em ambos os lados da membrana. A pressão parcial da amônia será proporcional á sua concentração.

A amônia difundida através da membrana sofre hidrólise na solução de referência interna e reage com a água :



$$k = \frac{[\text{NH}_4^+] [\text{OH}^-]}{[\text{NH}_3]}$$

A solução de referência interna contém cloreto de amônio em concentração suficiente de modo que seja considerada fixa.

$$\text{Então : } [\text{OH}^-] = [\text{NH}_3] \times k$$

O potencial do eletrodo sensível à amônia varia de maneira nernstiana com a mudança da concentração de hidróxido na solução de referência interna. O eletrodo portanto responde a amônia.

$$E = E_1 - S \log [\text{NH}_3]$$

O primeiro eletrodo enzimático para uréia [127] consistia de urease fisicamente imobilizada em gel de poliacrilamida na superfície de eletrodo seletivo a amônio. Este eletrodo respondia a mudança da concentração de uréia de  $5 \times 10^{-5}$  à  $1 \times 10^{-1}$  M com tempo de resposta de cerca de 35 segundos e tempo de vida de 14 dias. Com a utilização de um filme de celofane sobre o sensor com a enzima imobilizada este tempo foi ampliado para 3 semanas.

Quando o eletrodo enzimático era colocado em contato com a solução contendo uréia, o substrato se difunde na camada enzimática, ocorrendo a decomposição da ureia em íons  $\text{NH}_3$  e  $\text{CO}_2$ .

O íon amônio produzido era monitorado pelo eletrodo de vidro semelhante a determinação de pH. Este eletrodo também respondia a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Li}^+$  quando presentes em quantidades apreciáveis. No caso de um eletrodo de membrana líquida de tipo  $\text{NH}_4^+$ , a reação na camada da enzima imobilizada pode ser afetada pelo contato com o solvente orgânico ocasionando a perda de atividade.

O isolamento da camada líquida com membrana de diálise acarreta maior tempo de resposta além de precisarem ser renovados periodicamente [128]. Tran-Minh et alii [129] desenvolveram um eletrodo para cation monovalente com urease imobilizada por ligação covalente, utilizando albumina de soro bovino e glutaraldeído.

Para evitar a interferência de sódio e potássio, Guilbault e

Hrabankova [35] usaram uma resina trocadora de ions e um eletrodo seletivo a cátion amônio com sensibilidade até  $10^{-6}$  M e precisão entre 2 à 3 %.

Guilbault et alii [36] desenvolveram um eletrodo para cátion amônio usando borracha de silicone e nonactin. O coeficiente de seletividade foi 6,5 para  $\text{NH}_4^+/\text{K}^+$  e  $7,5 \times 10^2$  para  $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$ . Este eletrodo foi usado por mais de uma semana com pouca perda de atividade, apresentando resposta lenta e efeito de membrana forte, devido a velocidade lenta de difusão do substrato na membrana.

Guilbault e Schu [130] desenvolveram um eletrodo enzimático para determinação de uréia baseado num sensor para  $\text{CO}_2$ . Este foi usado inicialmente por fisiologistas para determinações rápidas de  $\text{P}_{\text{CO}_2}$  em sangue [131]. O eletrodo consiste de uma combinação de um eletrodo de referência, um de vidro para pH e uma membrana permeável a gás. Entre o eletrodo de vidro e a membrana há uma camada de solução de bicarbonato de sódio. Uma camada de urease, foi imobilizada na membrana permeável a gás e o eletrodo apresentou comportamento nerstiano na faixa de  $10^{-4}$  a  $10^{-1}$  M com tempo de resposta de 1 à 3 minutos sendo que os ions  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  não interferem.

Um eletrodo enzimático específico, foi descrito por Mascini e Guilbault [37] com a urease imobilizada quimicamente com glutaraldeido e albumina de soro bovino numa membrana de teflon especial. O tempo de resposta foi de 2 minutos com coeficiente angular de 55mV/década para concentração de  $1 \times 10^{-4}$  à  $5 \times 10^{-3}$  M de uréia. Pode-se chegar a realizar até 20 determinações por hora com excelente correlação.

Tran Minh et alii [129] usaram urease imobilizada por

ligação cruzada com glutaraldeído e albumina de soro bovino em sensor de  $\text{CO}_2$  obtendo resposta similar a Guilbault et alii [35,36,37].

Um método para medir uréia em sangue, utilizando um sistema de 3 eletrodos, também descrito por Guilbault et alii [126], apresentou concordância com método espectrofotométrico, sendo o eletrodo estável por 4 meses.

Anfalti et alii [132] desenvolveram um eletrodo enzimático para uréia utilizando eletrodo sensível a gás amônia. A urease foi imobilizada covalentemente na membrana permeável a gás amônia. Este eletrodo era livre de interferentes e respondia a uréia numa faixa de concentração de  $1 \times 10^{-4}$  à  $1 \times 10^{-2}$  M, com coeficiente angular de 69,5 mV/década, a pH 7,0 e tempo de resposta 3 à 5 minutos.

A uréia pode ser determinada amperometricamente com urease imobilizada em PVA e presa com membrana de diálise a um eletrodo de platina. A dependência do pH na oxidação da hidrazina naquele eletrodo é usada para monitorar a reação. A relação entre corrente e concentração em soluções alcalina e ácida mostra-se linear para concentração de uréia entre 1 à 80 mM com amostras de 50  $\mu$ l com adições em 2ml de tampão hidrazina.

Paspatathopoulos e Rechnitz [133] desenvolveram um eletrodo para determinação de uréia em sangue baseado num eletrodo sensível a gás amônia. A urease era imobilizada na superfície da membrana permeável a gás por meio de uma membrana de diálise. A resposta foi linear numa concentração de  $5 \times 10^{-4}$  à  $7 \times 10^{-2}$  M com coeficiente angular de 90,7 mV permanecendo estável por 20 dias. O tempo de resposta foi de 5 minutos.

Alexander e Joseph [134] imobilizaram urease em PVC

acoplado num eletrodo de antimônio, obtendo uma resposta linear na faixa de concentração de  $5 \times 10^{-4}$  à  $1 \times 10^{-2}$  M de uréia com coeficiente angular de 44mV/década. O eletrodo foi estável por uma semana com tempo de resposta de 1 à 2 minutos apresentando mudança de potencial absoluto a cada dia de uso.

O aparecimento de um potenciômetro diferencial com sensibilidade de até  $10^{-4}$  unidades de pH [135] contribuiu para a construção de sensores de uréia não influenciáveis pelo pH das soluções biológicas [136].

Kulys et alii [137] usaram um eletrodo de antimônio com uma resistência de  $0,1 \text{ mm}^{-2}$  obtendo resposta nerstiana simplificando o circuito de medida.

Sensores potenciométricos cobertos com enzimas imobilizadas fisicamente [138] têm sido usados largamente. Estes sensores têm sido feitos a partir de uma grande variedade de materiais [139]. Recentemente sensores de pH têm sido construídos com óxidos de paládio [140], estanho [141], irídio [142] e tungstênio [143].

Ianniello e Yacynych [139] construíram um eletrodo com óxido de antimônio que responde a mudança de pH. A urease foi imobilizada em PVC e colocada no sensor do eletrodo. A resposta foi linear para concentração de uréia de  $10^{-5}$  à  $10^{-3}$  M para 12 dias.

O princípio de funcionamento de transistores de efeito de campo para determinações de espécies iônicas é baseado na ampliação dos sinais elétricos. Quando se substitue o gatilho de um transistor por uma membrana seletiva, a diferença de potencial gerada na interface eletrodo/solução a qual depende da atividade iônica monitorada, altera o fluxo de corrente entre o dreno e a fonte. Deste

modo, a corrente que flui através do sistema é proporcional à atividade do íon de interesse em solução.

O desenvolvimento de eletrodos desse tipo tem recebido a atenção de muitos pesquisadores [144,145].

Revisões periódicas tem sido apresentadas por Koryta [146], bem como em livros especializados [147-149] e diversos "Proceedings" de simpósios realizados [150-152].

Polímeros orgânicos têm-se mostrado apropriados para serem usados como material condutor em eletrodos [153-155]. Recentemente filmes poliméricos foram usados como modificadores de superfície de eletrodos, mostrando-se potenciometricamente promissora sua aplicação em determinações analíticas. Alguns trabalhos usam os eletrodos modificados como sensor potenciométrico, no caso de um sensor de pH [156,158], as propriedades ácido-base dos filmes eletricamente depositados na superfície do eletrodo são usadas para resposta de pH. Em muitos casos, usa-se as interações dos sistemas redox na superfície dos eletrodos ou mudanças de superfícies durante o uso.

Nylander et alii [159] usaram as propriedades do polipirrol em eletrodo seletivo a amônia. Pandey e Nishro [160] descreveram um microssensor para uréia utilizando um filme de polipirrol na superfície de um eletrodo de platina.

Palleschi et alii [161] prepararam um eletrodo baseado numa resina condutora de carbono-epoxi, sólida em PVC com a vantagem de eliminar a solução de referência interna e conseqüentemente o eletrodo de referência. É possível obter desta maneira um sensor para ureia com baixo custo, boa precisão e tempo de resposta de menos de um minuto.

Guilbault e Tarp [162] descreveram um eletrodo para uréia baseado no "air gap" de Ruzicka e Hansen [79]. Os autores projetaram um eletrodo seletivo a ions ficando suspenso acima da solução de medida da amostra. Neste caso, o eletrólito é estabilizado por um agente hidrofílico como gelatina e aplicado ao eletrodo seletivo antes de cada medida. O resultado é uma rápida volta á linha de base.

### B. ELETRODOS COM OUTRAS FONTES DE UREASE

A habilidade das flores de converterem substratos bioquímicos em produtos voláteis foi utilizado por Uchiyama e Rechnitz [163] para desenvolverem um eletrodo sensível a uréia. Materiais biocatalíticos como microorganismos e tecidos de plantas e animais têm demonstrado propriedades atrativas em certas circunstâncias [164,165].

As rosas são ricas de materiais biocatalíticos, assim como folhas, sementes e alguns tipos de plantas [166,167]. O odor das flores é uma indicação de produção de material volátil que é compatível com eletrodo sensível a gás.

Pétalas de rosas foram maceradas e misturadas com tampão Tris-HCl 0,2M pH 7,3 ou 8,0 e colocadas como pasta em forma de sanduiche em um eletrodo para amônia com uma membrana de diálise externa. Tanto pétalas de rosa vermelha como cravo apresentam alto nível de urease.

Eletrodos com 30 mg de cravo branco apresentam um coeficiente angular de 48 mV/ década para concentração de uréia de  $2 \times 10^{-5}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M, tempo de resposta de 10 minutos a pH 7,4 e tempo de vida de 10 dias.

### C. ELETRODO COM CÉLULAS MICROBIOLÓGICAS

Um eletrodo microbiológico consistindo de uma bactéria nitrificante e um eletrodo sensível a oxigênio foi desenvolvido por Karube et alii [168]. A amônia é sucessivamente oxidada a nitrito e nitrato por bactérias nitrificantes como Nitrosomonas e Nitrobactérias. O sensor de ureia consiste de urease imobilizada, bactéria imobilizada e um eletrodo de oxigênio. A urease é imobilizada em PVC [169] e as bactérias nitrificantes são cultivadas e imobilizadas em acetilcelulose. A membrana com a bactéria é colocado no sensor do eletrodo de oxigênio e sobre esta é colocada a membrana com a urease imobilizada. Ambas as membranas são seguras com membrana de diálise e presa com O-ring. O sensor pode ser usado para determinação de cerca de 200 amostras, num período de 2 semanas [170].

### D. ELETRODO ENZIMÁTICO PARA UREIA EM ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO

Técnicas de análise por injeção em fluxo têm sido estabelecidas para soluções homogêneas. Amostras heterogêneas como sangue têm apresentado problemas de diferença na dispersão de dois tipos de amostra. Em análise por injeção em fluxo é importante que a dispersão das amostras seja constante e reprodutível de modo que soluções desconhecidas devem ser igualmente tratadas.

Harrow e Janata [171] mostraram que a presença de células vermelhas do sangue pode levar a resultados errados devido a problemas de suspensão. Para evitar erros deste tipo o coeficiente de dispersão

deve ser o mais próximo de 1, ou seja a distância entre a injeção e a detecção deve ser minimizada.

Bo. A. Peterson [172] desenvolveu um sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de uréia em sangue com urease covalentemente imobilizada sobre eletrodo seletivo ao cation amônio obtendo uma frequência de 40 amostras por hora num média de concentração de ureia de 1 à 40 mM e um desvio padrão de 1 %. A interferência de potássio foi reduzida para menos de 3%.

As técnicas e características operacionais desses equipamentos para determinação em análises por fluxo têm sido descritos em revisões [173,174].

O desenvolvimento de detectores eletroquímicos para sistemas contínuos tem crescido muito nos últimos anos [175,177]. Wang [178] estudou o comportamento de eletrodos modificados para detecção em sistema de fluxo dando especial atenção à modificação da superfície eletroativa de tais sensores.

#### E. MICROSSENSORES

Uma área promissora para aplicação de biosensores envolve os microssensores. Recentemente um microssensor para uréia foi preparado por imobilização de urease num eletrodo de antimônio [179]. Joseph [180] construiu um microeletrodo para amônia do tipo "air gap" com 10 $\mu$ m de diâmetro com resposta entre 30 à 45 segundos para concentração de uréia  $10^{-4}$  à  $10^{-2}$  M e tempo de vida de uma semana.

## CAPÍTULO VII

# OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA UREASE ATRAVÉS DAS FONTES VEGETAIS CANAVALLIA ENSIFORMIS E CANAVALLIA MARÍTIMA

### A. INTRODUÇÃO

Como fontes alternativas de urease foram estudadas as leguminosas: *Canavalia ensiformis*, fornecida pelo Instituto Agronômico de Campinas e a *Canavalia marítima*, cedida pelo professor Kurtz Rehn do Departamento de Bioquímica da UFPE, na forma bruta. A urease pura foi obtida da Sigma, tipo II C, cat. n<sup>o</sup> U 8876 com 12.000 U/g.

### B. PARTE EXPERIMENTAL

#### 1. APARELHAGEM

Utilizou-se um espectrofotômetro VARIANT modelo 219 para as leituras de absorbâncias, e um potenciômetro MICRONAL modelo B-375 para as medidas de pH. Todas as medidas foram realizadas em banho Thermostat U-10 com temperatura controlada a  $25 \pm 0,2$  °C.

## 2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA UREASE

Para determinação da atividade da urease contida nas leguminosas, utilizaram-se os métodos espectrofotométrico e potenciométrico.

### 2.1 DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA ATIVIDADE DA UREASE

Utilizou-se o método espectrofotométrico de Chaney e Marbach [27]. A amônia liberada pela ação da urease sobre a uréia, reage com o fenol na presença de hipoclorito de sódio, produzindo o indofenol azul.

Para cada determinação, as amostras foram incubadas, transferindo-se alíquotas de solução de uréia suficiente para uma faixa de concentração entre 0,286 à 0,572  $\mu\text{M}$ ; para tubos de ensaio contendo 0,4 ml de EDTA 1%, pH 6,5 e 36 à 143 mg de leguminosa finamente triturada, adicionando-se água desionizada para um volume final de 1,4 ml. Em seguida, foram agitadas e colocadas em banho termostatizado a 25°C durante tempo pré-estabelecido de 1 a 20 minutos. Para o desenvolvimento do composto colorido transferiu-se 0,7ml da amostra incubada para tubos de ensaio, adicionando-se 1,0 ml de hipoclorito de sódio e 1,0 ml de fenolnitroprussiato. A mistura depois de agitada foi colocada em banho termostatizado a 37°C durante 20 minutos, e as absorbâncias foram lidas a 560nm.

A quantidade de amônia liberada foi determinada usando uma

curva de calibração para amônia, construída por diluições sucessivas de uma solução padrão de cloreto de amônio 7,63 mg %.

## 2.2. DETERMINAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA ATIVIDADE DA UREASE

A amônia liberada na hidrólise da uréia catalisada pela urease, difunde-se através da membrana de "teflon" colocada na base de um eletrodo sensível a amônia, da Universal Sensors. Esta difusão prossegue até que as pressões parciais da amônia na amostra e na membrana sejam iguais. A amônia reage com o eletrólito, na solução de referência interna, para formar íon amônio e íon hidroxila.

A mudança de pH resultante é medida por um eletrodo de vidro. A quantidade de amônia liberada foi calculada usando uma curva de calibração na faixa de concentração de  $5,66 \times 10^{-3}$  a  $4,88 \times 10^{-1}$  M de cloreto de amônio, em solução tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5.

Uma massa conhecida (36 à 143 mg) do pó das leguminosas, ou da urease pura, foram dissolvidas em 2,0ml de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0. O eletrodo para amônia foi imerso na solução e esperou-se o potencial estabilizar. Adicionou-se solução de uréia observando-se o potencial a cada minuto.

## 2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA

Para determinação da atividade específica as sementes das leguminosas foram trituradas, após eliminação do revestimento externo. Fez-se uma extração prévia dos lipídios com metanol, seguindo a

metodologia de Folch et alii [181].

Em seguida as amostras foram submetidas a hidrólise ácida (HCl 6M, 48 horas a 110°C), sendo os amino ácidos estimados após neutralização pelo método de Cocking Yemm [182]. A atividade específica foi calculada através de curva de calibração para albumina de soro bovino (1mg/1ml).

### 3. RESPOSTA DO ELETRODO COM A UREASE EM SUSPENSÃO

Como a atividade da urease da *Canavalia maritima* mostrou-se superior a da *Canavalia ensiformis*, decidiu-se estudá-la mais detalhadamente, utilizando-se um eletrodo sensível a amônia.

Este eletrodo foi colocado em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0 por 2 horas antes de cada uso. A enzima em pó foi colocada em célula de vidro de capacidade de 10 ml, termostatizada juntamente com 2,0ml de tampão Tris-HCl 0,1M e o sistema foi submetido a agitação constante.

Para cada determinação, a enzima foi colocada na célula, esperando-se a estabilização do potencial, para efetuar a medida.

#### 3.1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA UREASE

Após retirada das cascas, as sementes da *Canavalia maritima* foram trituradas em almofariz de porcelana e passadas em peneira de 100 mesh. Massas que variaram de 0,5 a 5,5 mg do pó por ml, foram colocadas em uma célula termostatizada a 25  $\pm$  0,2°C e 2,0 ml de

tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0 foram adicionados. Após estabilização do potencial foram feitas adições de uréia para uma concentração final entre  $10^{-2}$  à  $10^{-4}$  M. Curvas de calibração foram construídas para cada concentração enzimática.

### 3.2. EFEITO DA TEMPERATURA

Foram adicionados 3,5mg/ml do pó em célula de vidro com 2,0 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0. Variou-se a temperatura de 15 à 45°C e para cada temperatura construiu-se curva de calibração.

### 3.3. EFEITO DO pH

Aliquotas de 7,0 mg da *Canavalia marítima* foram colocadas em célula termostatizada a  $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$  com 2,0 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M, nas faixas de pH de 7,0 à 8,0. Após estabilizar o potencial, alíquotas de solução de ureia foram adicionadas e curvas de calibração foram traçadas.

### 3.4. TEMPO DE RESPOSTA

Amostras de 7,0 mg da *Canavalia marítima* foram levadas a reagir com alíquotas de ureia em pH 7,0, tampão Tris-HCl 0,1 M à  $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$  até a estabilização do potencial fazendo-se a registro a cada minuto. A cada concentração de uréia foi feita uma curva de potencial versus tempo.

## C. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os resultados experimentais das atividades das leguminosas foram calculados a partir de curvas de calibração para amônia (figura 9 e 10), e da atividade específica a partir de curvas de calibração para albumina de soro bovino (figura 11), e se encontram nas tabelas IV e V.

Em ambos os métodos utilizados, ficou evidenciado que a *Canavalia marítima* apresentou atividade maior que o da *Canavalia ensiformis*, utilizada como fonte da urease pura.

Convencionou-se que a atividade da urease estudada seria a quantidade da enzima que cataliza a liberação de um micromol de  $\text{NH}_3$  por minuto, nas condições experimentais utilizadas.

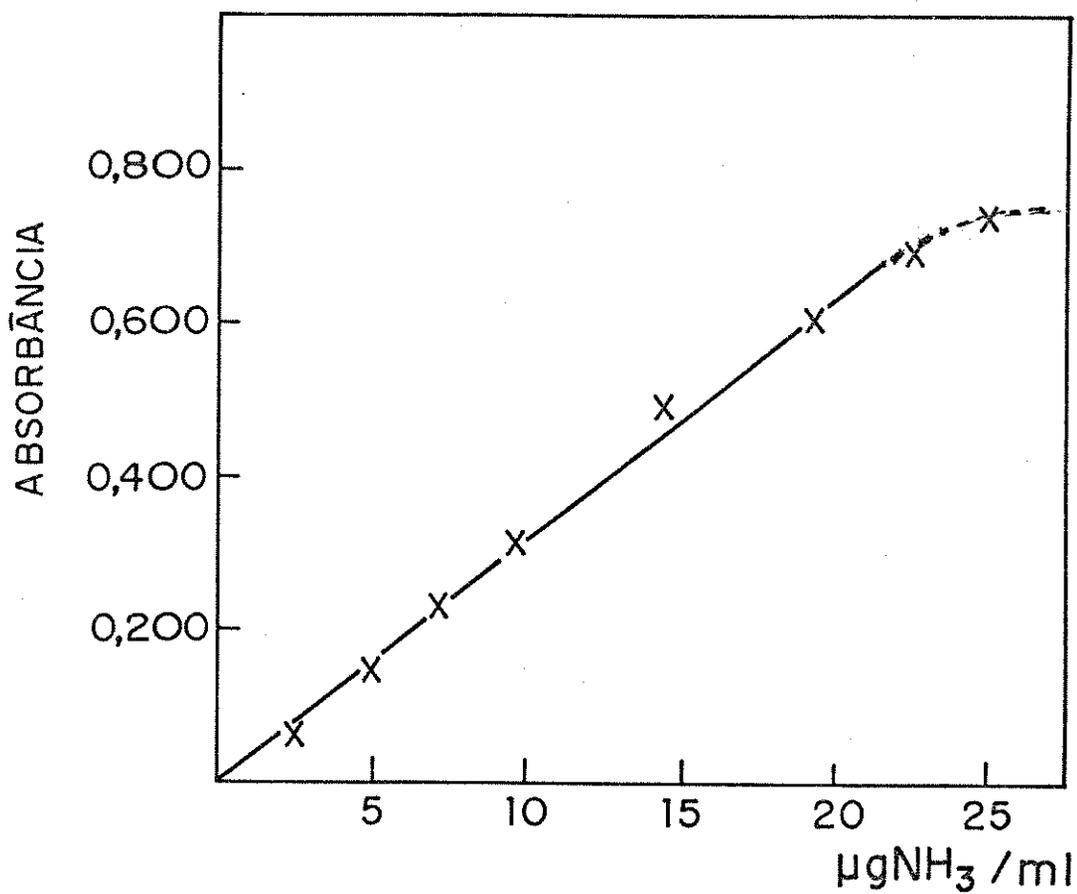


Figura 9- Curva de calibração para  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Método espectrofotométrico do indofenol azul, comprimento de onda 560 nm.

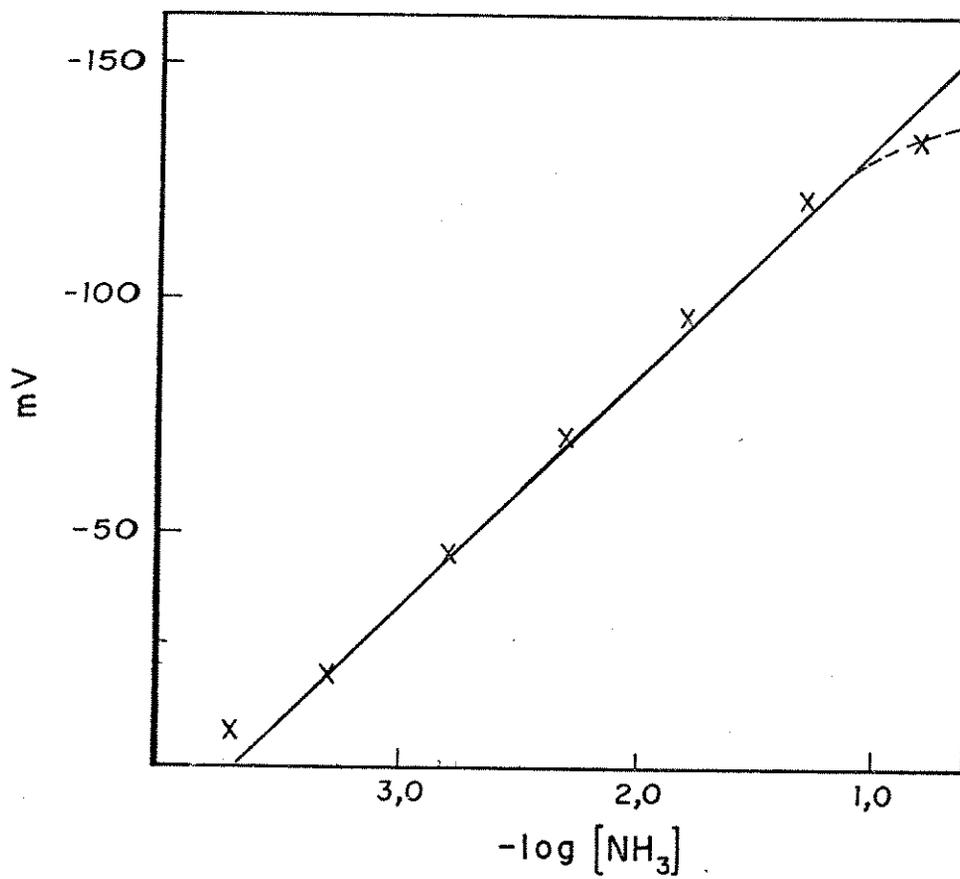


Figura 10- Curva de calibração para  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Método potenciométrico,  $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$  tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. Eletrodo seletivo para amônia.

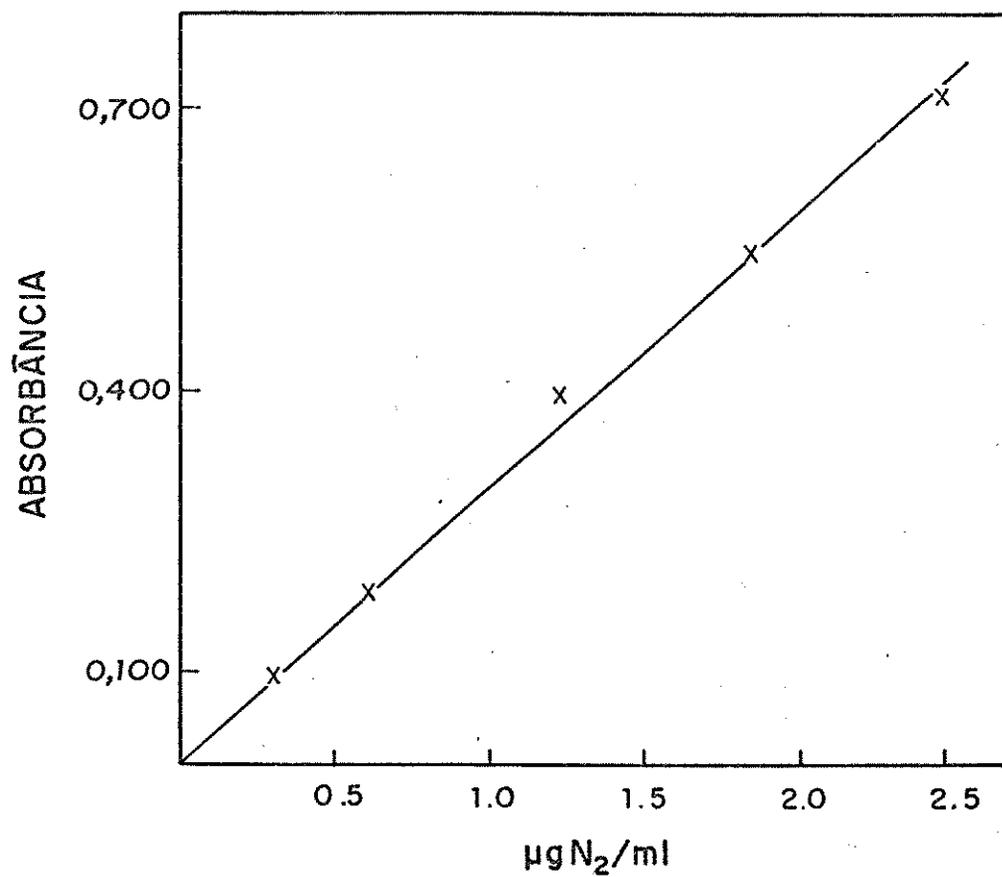


Figura 11- Curva de calibração para aminoácidos (atividade específica), tampão citrato 0,2 M, pH 5,0, comprimento de onda 570 nm

Tabela IV- Atividade e atividade específica. Método espectrofotométrico.

Fonte	concentração de uréia CmM					
	0,28		0,43		0,57	
	U/mg pó	U/mg proteína	U/mg pó	U/mg proteína	U/mg pó	U/mg proteína
Canavalia ensiformis	0,0800	0,470	0,110	0,650	0,130	0,770
Canavalia marítima	0,0800	0,560	0,230	1,61	0,240	1,68
Urease pura	2,12	2,12	5,19	5,19	5,29	5,29

Tabela V- Atividade e atividade específica. Método potenciométrico

concentração de uréia (mM)	atividade	Fonte		
		Carnavalia ensiformis	Carnavalia marítima	urease pura
0,570	U/mg pó	0,120	0,320	8,52
	U/mg proteína	0,710	2,24	8,52
2,80	U/mg pó	0,140	0,470	9,42
	U/mg proteína	0,83	3,29	9,42
5,70	U/mg pó	0,150	0,490	10,2
	U/mg proteína	0,890	3,43	10,2
28,0	U/mg pó	0,190	0,600	10,3
	U/mg proteína	1,21	4,20	10,3
57,0	U/mg pó	0,240	0,770	10,6
	U/mg proteína	1,42	5,38	10,6
280	U/mg pó	0,860	1,05	10,7
	U/mg proteína	5,09	7,34	10,7
570	U/mg pó	0,890	1,09	11,0
	U/mg proteína	5,27	1,09	11,0

## 2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA

De acordo com a equação de Michaelis-Menten, observa-se um aumento na velocidade de reação quando se aumenta a concentração da enzima, porém este aumento cessa para concentrações altas da enzima. A figura 12 apresenta um gráfico do coeficiente angular/década em função da concentração da enzima os quais foram obtidos a partir de várias curvas de calibração, podendo-se observar que 3,5 mg de pó/ml foi uma quantidade ideal para obtenção de resposta nernstiana.

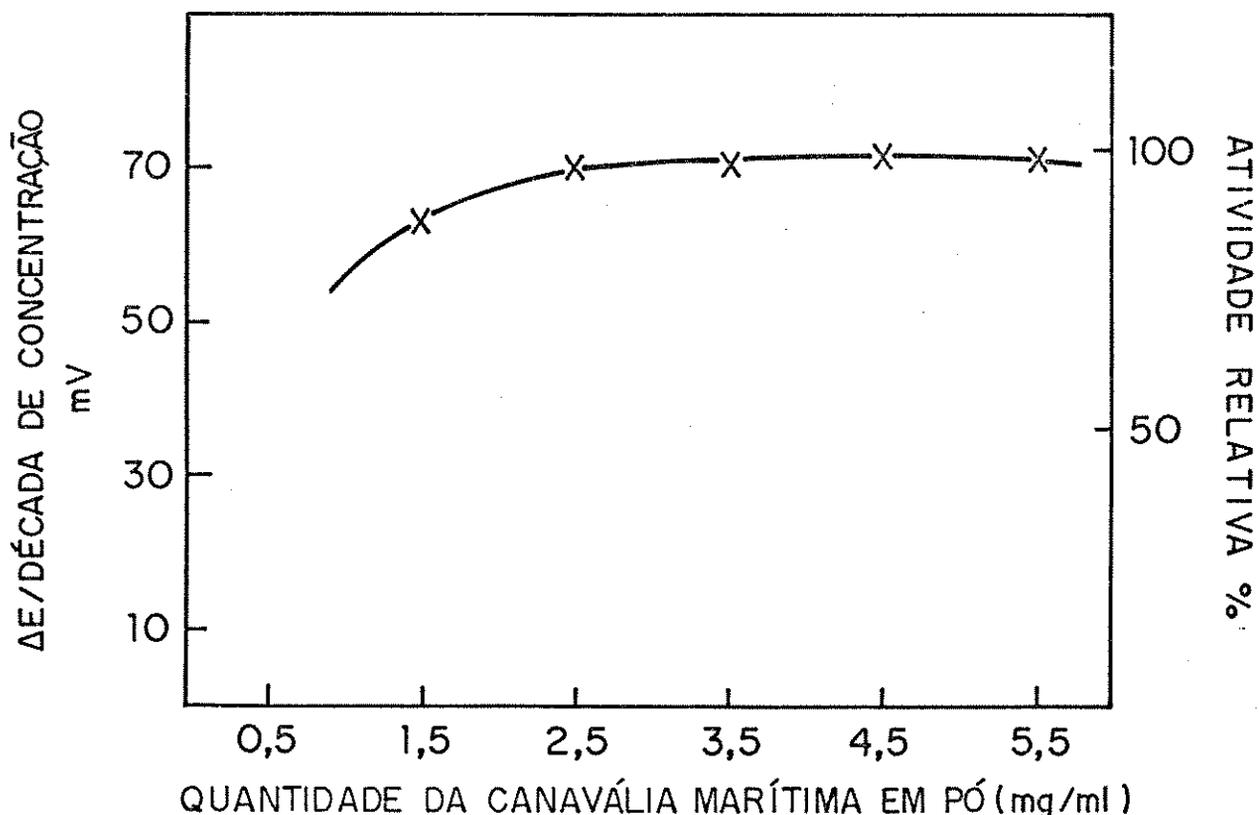


Figura 12 - Estudo do efeito da concentração da enzima Canavalia marítima em suspensão na resposta do eletrodo seletivo a amônia. Tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0,  $25,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ .

### 3. EFEITO DA TEMPERATURA

O aumento da temperatura numa reação enzimática, leva ao aumento na velocidade da reação, mas também causa perda da atividade catalítica da enzima. Na figura 13, pode-se observar o efeito da temperatura na atividade da urease, na faixa de 25 á 35 °C. As inclinações das curvas de calibração aumentam de acordo com o previsto pela equação de Nernst.

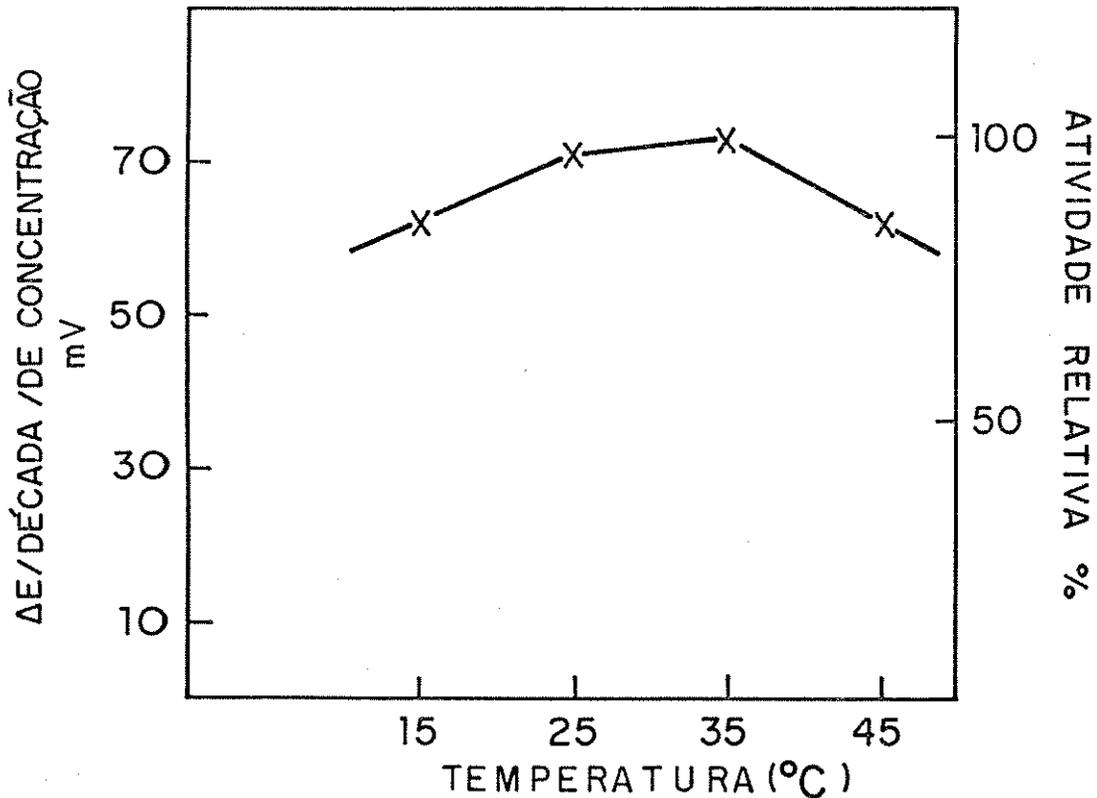


Figura 13 - Estudo do efeito da temperatura da enzima *Canavalia marítima* em suspensão na resposta do eletrodo seletivo a amônia. Tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0, 3,5mg da enzima em pó/ml.

#### 4. EFEITO DO pH E TAMPÃO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O pH ótimo para a urease obtido da *Canavalia maritima* está na faixa de 7,0 á 7,5 através de medidas com tampão Tris-HCl 0,1M. Conforme apresenta a figura 14, é possível utilizar em pH maiores que 7,5, porém com perda de atividade da enzima.

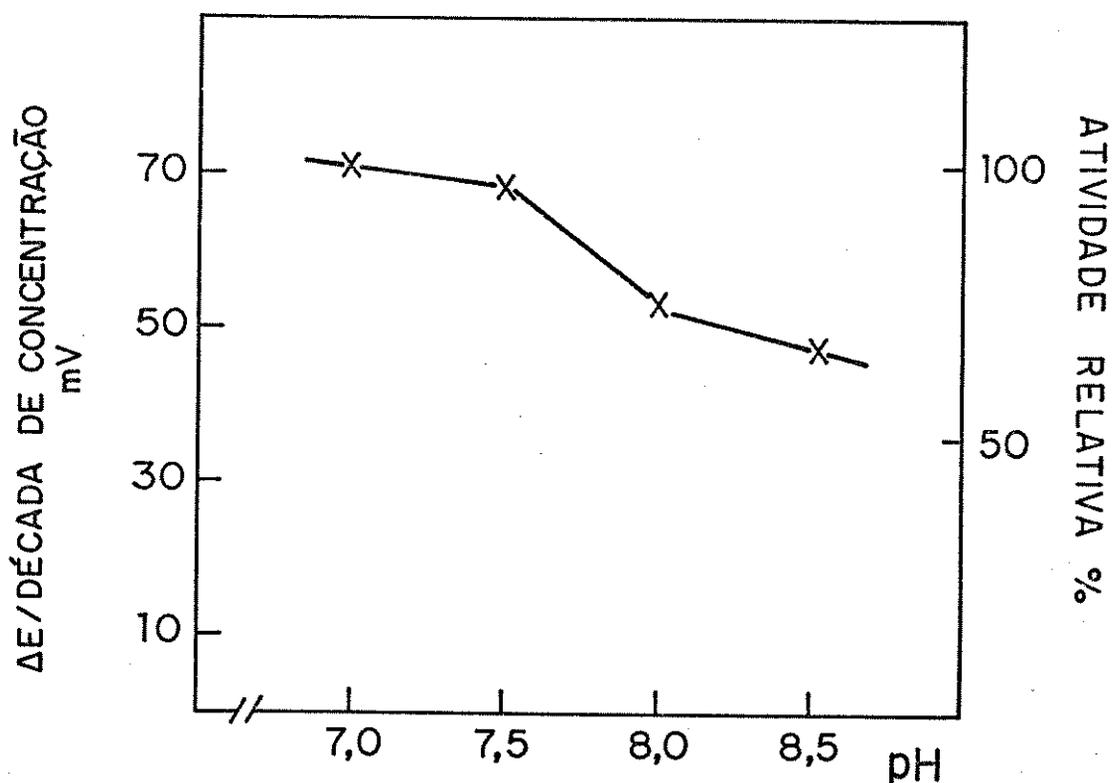


Figura 14 - Estudo do efeito do pH da enzima *Canavalia maritima* em suspensão na resposta do eletrodo seletivo a amônia. Tampão Tris-HCl 0,1M ,25,0  $\pm$  0,2°C; 3,5mg da enzima em pó/ml.

## 5. EFEITO DO TEMPO DE RESPOSTA

O eletrodo apresenta um tempo de resposta de 5 minutos, conforme evidenciado na figura 15.

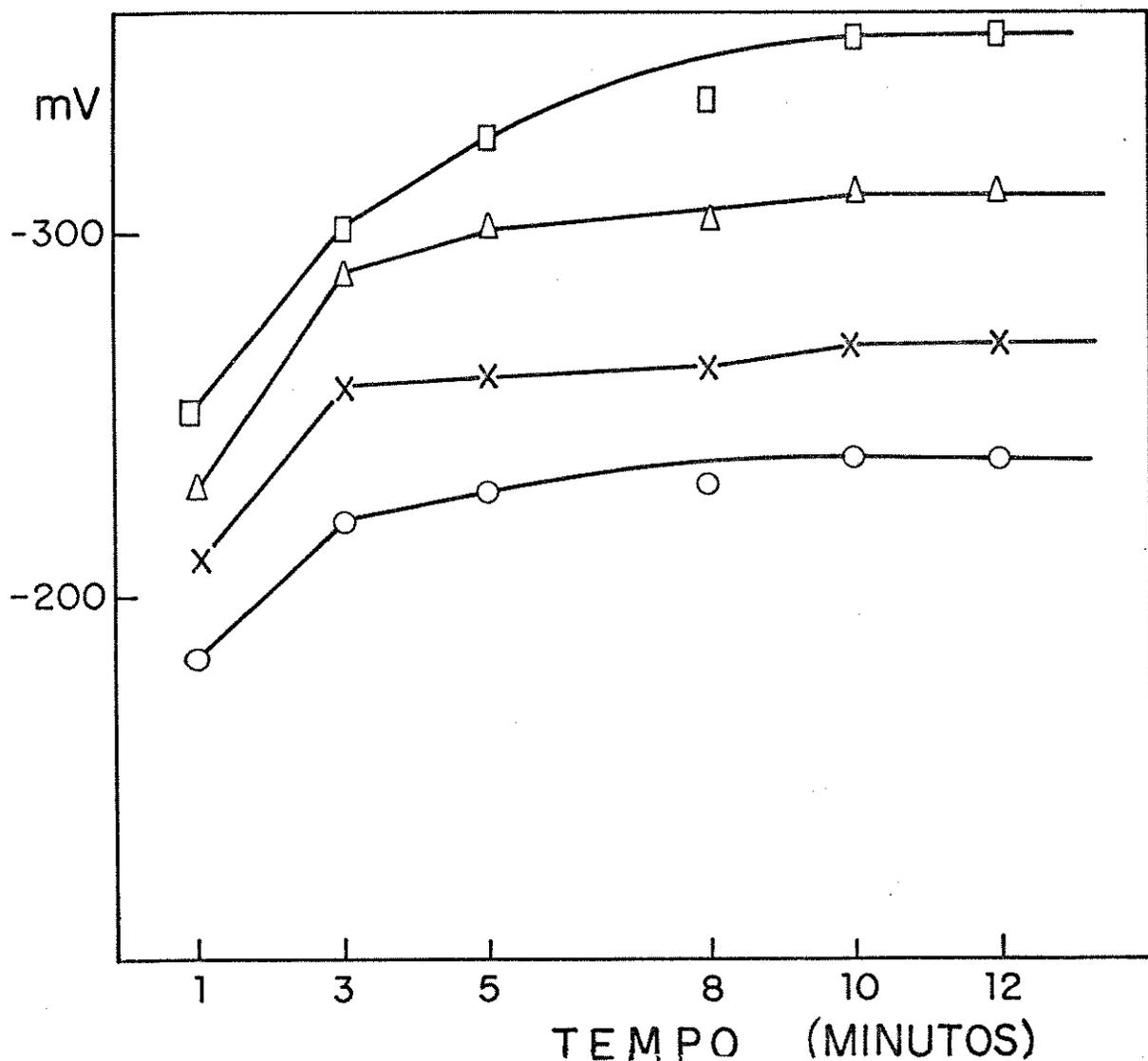


Figura 15 - Estudo do tempo de resposta da enzima *Canavalia maritima* em suspensão. Tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0, 25,0  $\pm$  0,2°C; 3,5mg da enzima em pó/ml. Eletrodo seletivo para amônia. Concentração de uréia : ○- 4,98 x 10<sup>-4</sup>M; X- 1,48 x 10<sup>-3</sup>M; △- 6,10 x 10<sup>-3</sup> M; □- 1,60 x 10<sup>-2</sup>M.

## CAPITULO VIII

# CONSTRUÇÃO DE ELETRODO ENZIMÁTICO PARA UREIA UTILIZANDO A UREASE OBTIDA DA CANAVALLIA MARÍTIMA

### A. INTRODUÇÃO

No capítulo anterior, concluiu-se através dos estudos de atividade específica, que a *Canavalia marítima* possui uma quantidade maior de urease que a *Canavalia ensiformis*. Em vista deste fato, optou-se pela fonte de enzima *Canavalia marítima*, para a construção do eletrodo enzimático.

A figura 16 apresenta o esquema de um eletrodo sensível a amônia. Consiste de um eletrodo combinado de vidro dentro de um tubo plástico de 1,3 cm de diâmetro, com uma membrana de teflon fabricada pela Orion Research segura por O-ring de borracha que aprisiona a solução de referência interna separando-a solução da amostra.

As membranas com urease imobilizada foram colocadas sobre a membrana de "teflon" microporosa segura por membrana de diálise e com fita de teflon.

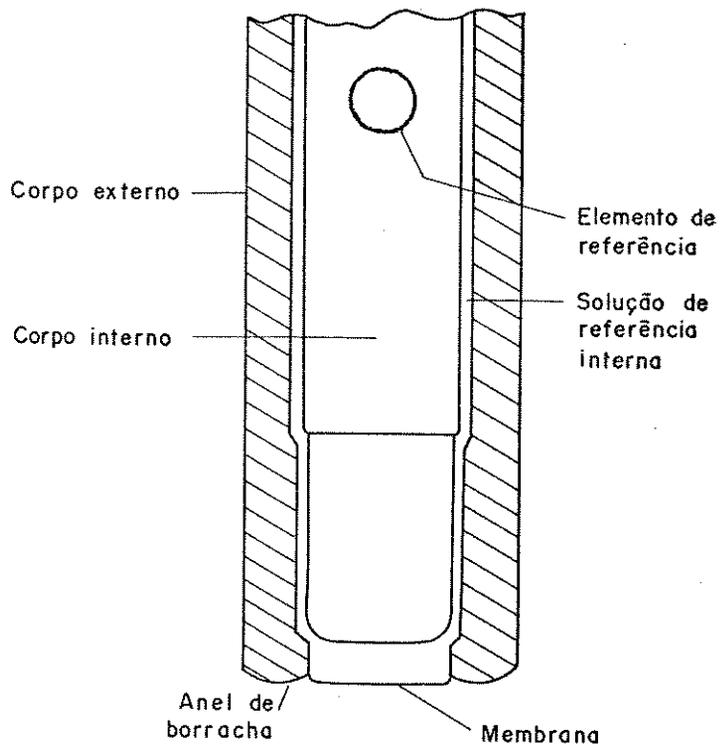


Figura 16 - Esquema do eletrodo sensível a gás amônia.

## B. PARTE EXPERIMENTAL

### 1. REAGENTES E MATERIAIS

Os tampões Tris-HCl e fosfato foram preparados em força iônica 0,1 e 0,2 M, utilizando-se reagentes de pureza analítica. Solução de uréia foi preparada na ocasião das determinações em tampão Tris-HCl.

Urease (Sigma 12U/mg).

Urease obtida da *Canavalia marítima*, através da simples remoção da casca das sementes, e posterior trituração; o pó da semente foi passado em peneira de 100 mesh.

Todo água utilizada foi desionizada

As medidas de potencial foram realizadas com potenciômetro Micronal, modelo B - 375, em células de vidro com capacidade de 10ml, termostatizadas a  $25 \pm 0,2$  °C em banho Thermostat U - 10. O eletrodo sensível a amônia foi da Universal Sensors.

### 2 CONSTRUÇÃO DO ELETRODO ENZIMÁTICO COM MEMBRANA DE PVC

Adicionaram-se 10 mg do pó da semente, 5,7 mg de PVC, 11,4 mg de dibutilftalato e 0,2 ml de tetrahidrofurano em bequer de 10 ml. Após cuidadosa agitação, foram colocados em uma forma de vidro circular de 1 cm de diâmetro (figura 17). Cobriu-se o sistema com papel de filtro durante 24 horas, em temperatura ambiente. A membrana obtida foi colocada sobre a membrana de teflon do eletrodo sensível a gás e coberta com uma membrana de diálise. O sistema foi mantido em

tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, quando não utilizado. Este eletrodo foi denominado de eletrodo I.

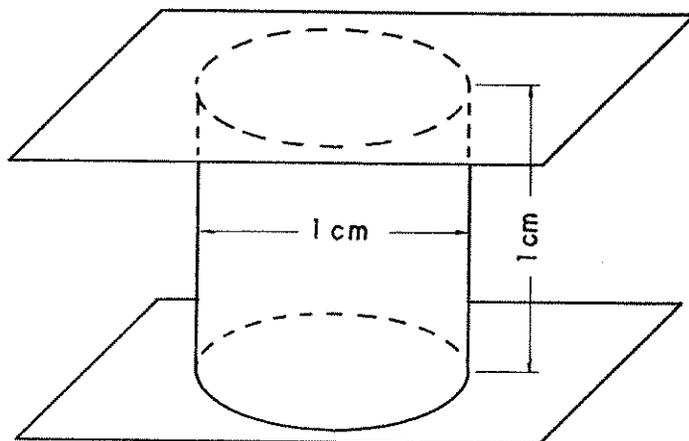


Figura 17- Forma de vidro com 1cm de diâmetro e 1 cm de altura para preparação das membranas de PVC.

### 3. CONSTRUÇÃO DO ELETRODO ENZIMÁTICO COM IMOBILIZAÇÃO DA UREASE COM GLUTARALDEIDO

Adicionaram-se 10 mg do pó da semente, sobre uma membrana de teflon no sensor de um eletrodo sensível a amônia, misturados com 5 $\mu$ l de tampão fosfato 0,1 M ,pH 7,0 com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida adicionou-se 5 $\mu$ l de glutaraldeido 12,5% homogeneizando-se a mistura até consistência de pasta uniforme. Deixou-se secar a temperatura ambiente ( $\pm$  25 °C) durante 15 minutos. A membrana

modificada foi então imersa em água desionizada por 15 minutos, depois em solução de glicina por 15 minutos e finalmente em tampão Tris-HCl 0,2M, pH 7,0. Denominou-se este eletrodo de II.

## G. AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS

### 1. ESPESSURA DAS MEMBRANAS

Foram preparadas membranas com quantidades de urease (pó da semente) que variaram de 7,0 à 20 mg e quantidades de PVC que variaram de 4,0 à 10 mg para o eletrodo da enzima imobilizada em PVC (eletrodo I).

Para o eletrodo com a enzima imobilizada com glutaraldeído, (eletrodo II), variou-se a quantidade de urease de 7,0 à 15 mg e a concentração do glutaraldeído de 2,5 a 25 %.

### 2. EFEITO DA TEMPERATURA

Os eletrodos foram testados sob agitação constante, de uma solução contendo 2,0 ml do tampão Tris-HCl 0,1 M e 0,2 M respectivamente para o eletrodo I e II, em células termostatizadas no intervalo de 15 a 45°C. Após estabilização do potencial, da solução de uréia 1M foi adicionada para uma concentração final de  $10^{-2}$  à  $10^{-4}$  M sendo 0,1M em NaCl e 0,1  $\mu$ M em EDTA.

As leituras de potenciais foram realizadas após 10 minutos.

### 3. EFEITO DO pH

A influência do pH foi estudada com dois tampões : Tris-HCl 0,1 M e 0,2 M e fosfato 0,1 M. Adotou-se o mesmo procedimento descrito no item anterior.

### 4. TEMPO DE RESPOSTA

Os eletrodos enzimáticos I e II foram levados a reagir com alíquotas de uréia na faixa de concentração que variou de  $10^{-3}$  à  $10^{-2}$  M em tampão Tris-HCl 0,1M e 0,2M respectivamente e pH 7,0, fazendo-se o registro do potencial em tempo pré estabelecido.

### 5. ESTABILIDADE OPERACIONAL

Os eletrodos I e II com as enzimas imobilizadas foram estocadas sob refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}$ ), quando fora de uso. A estabilidade dos eletrodos foi testada em intervalos de tempo pré estabelecidos e avaliada através de curvas de calibração em tampão Tris-HCl 0,1 e 0,2 M, pH 7,0.

#### 5.1. ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO

Membranas da urease (*Canavalia marítima*) imobilizadas com glutaraldeído foram armazenadas em placas de petri à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  e temperatura ambiente. Em cada dia programado, utilizou-se uma nova membrana, presa com membrana de diálise e após acondicionamento

do eletrodo por 2 horas no tampão Tris-HCl, efetuaram-se as medidas.

Construíram-se curvas de calibração para cada membrana utilizada.

#### 6. DETERMINAÇÃO DE $K_m$ E $V_{max}$

Construiu-se um gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk com as atividades enzimáticas obtidas anteriormente no capítulo VII, assim, determinando-se os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  para enzima em suspensão.

Para a enzima imobilizada utilizou-se o eletrodo II e determinou-se as velocidades iniciais. Utilizando-se o método de Lineaweaver Burk, grafando os resultados obtidos experimentalmente de  $1/v$  versus  $1/[S]$ , fazendo-se a regressão linear, traçou-se a melhor reta cujas intercepções correspondem respectivamente a  $1/V_{max}$  e  $-1/K_m$ .

## D. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA

A quantidade de enzima presente na superfície do eletrodo sensível a gás é crítica no que diz respeito à performance do biossensor. Fatores como tempo de vida, coeficiente angular, linearidade, dinâmica da resposta, têm sido relacionados com a concentração do biocatalizador [183].

Uma quantidade pequena de enzima não é suficiente para uma resposta precisa e uma quantidade elevada, aumenta a espessura da membrana aumentando o tempo de resposta.

O potencial de eletrodo se estabiliza tanto mais rapidamente quanto menor a espessura da membrana. A comparação dos diversos coeficientes angulares das curvas com as membranas de diversas espessuras evidenciaram este efeito, também demonstrado por outros autores.

As figuras 18 e 19 apresentam os resultados dos estudos sobre a concentração da urease. Tanto para o eletrodo I como II utilizou-se a mesma quantidade de pó (10 mg). Também realizaram-se estudos para determinar a concentração ótima do glutaraldeído e PVC, obtendo-se com 5,17 mg de PVC uma membrana com 0,6 mm de espessura, e com 5µl de glutaraldeído 12,5% uma membrana com 0,5 mm de espessura.

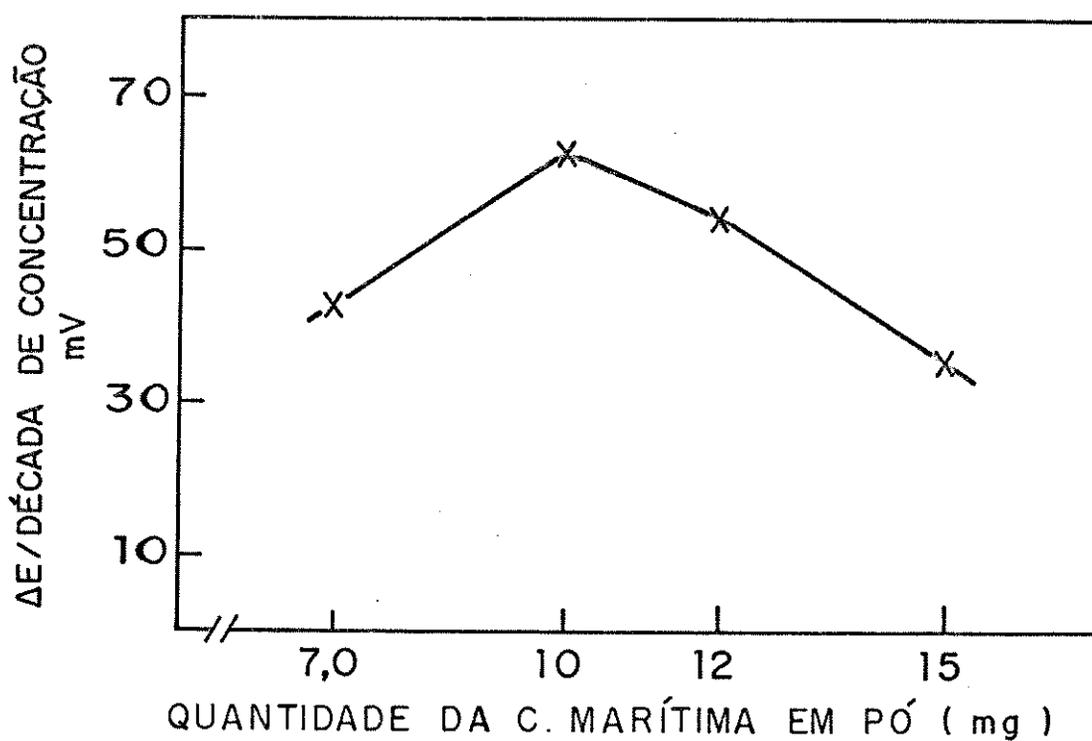


Figura 18- Estudo do efeito da concentração da enzima (Canavalia marítima) immobilizada em PVC, na resposta do eletrodo enzimático. Temperatura  $25 \pm 0,2$  °C tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,0.

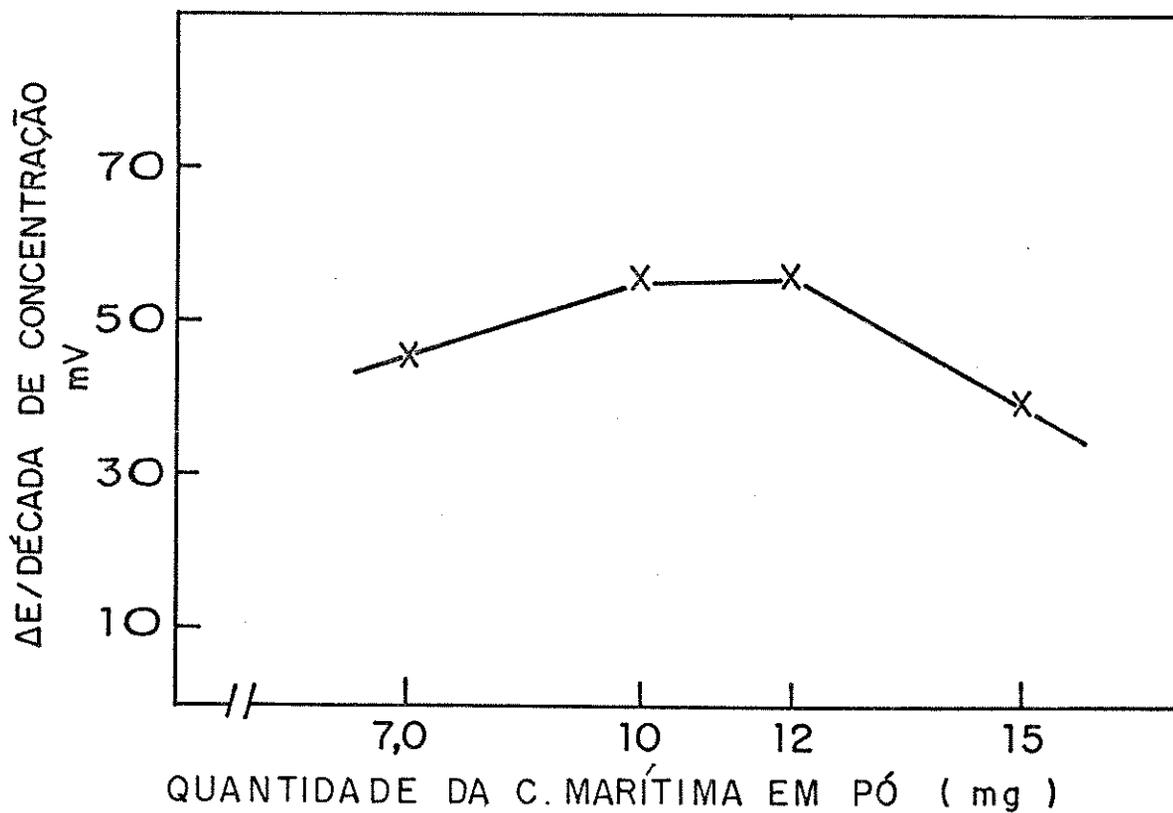


Figura 19- Estudo do efeito da concentração da enzima (*Canavalia marítima*) imobilizada com glutaraldeído, na resposta do eletrodo enzimático. Temperatura  $25 \pm 0,2$  °C tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0.

## 2. EFEITO DA TEMPERATURA

O efeito da temperatura na resposta dos eletrodos estão apresentados nas figuras 20 e 21. Foram estudadas temperaturas que variaram de 15 à 45°C. Acima de 25°C o eletrodo apresentou uma velocidade de reação maior, porém a enzima perde mais facilmente sua atividade.

As enzimas em suspensão perdem mais rapidamente a atividade a 35°C, e as imobilizadas mantêm mais de 90% de sua atividade acima de 35°C. A velocidade de imobilização e reativação é fortemente dependente da temperatura e está intrinsicamente ligada à mudança conformacional no centro ativo da enzima e ao seu método de imobilização

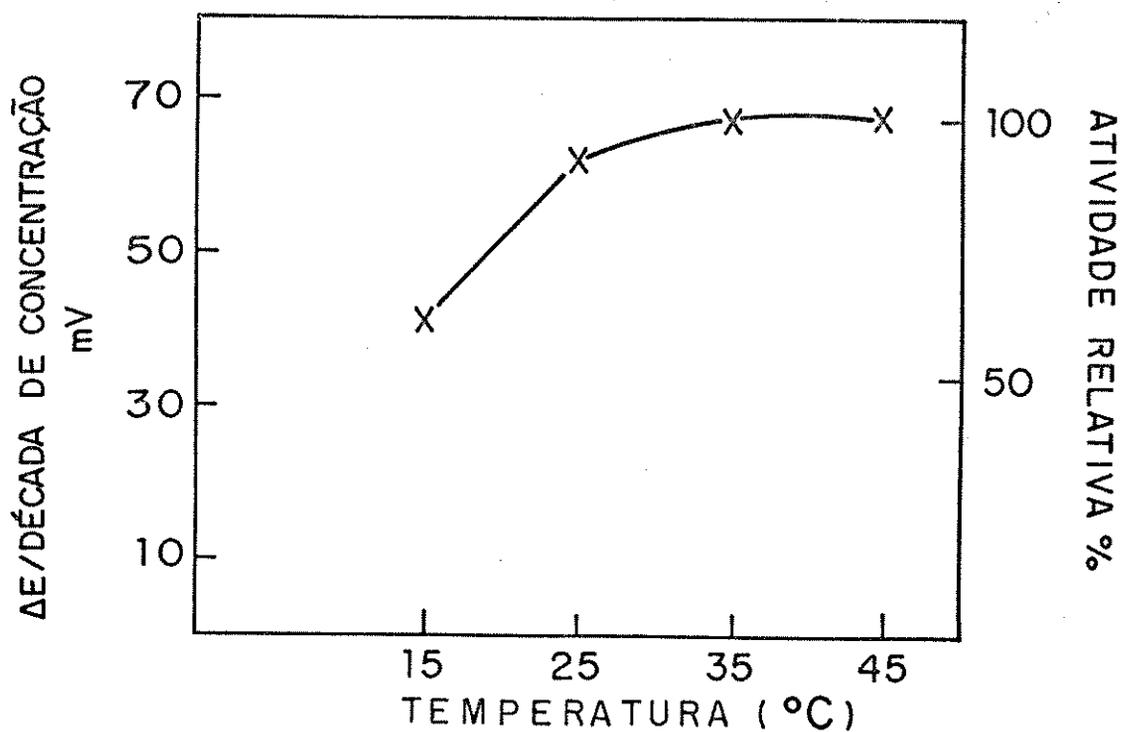


Figura 20- Estudo do efeito da temperatura da enzima (*Canvalia marítima*) immobilizada PVC, na resposta do eletrodo enzimático. Tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0.

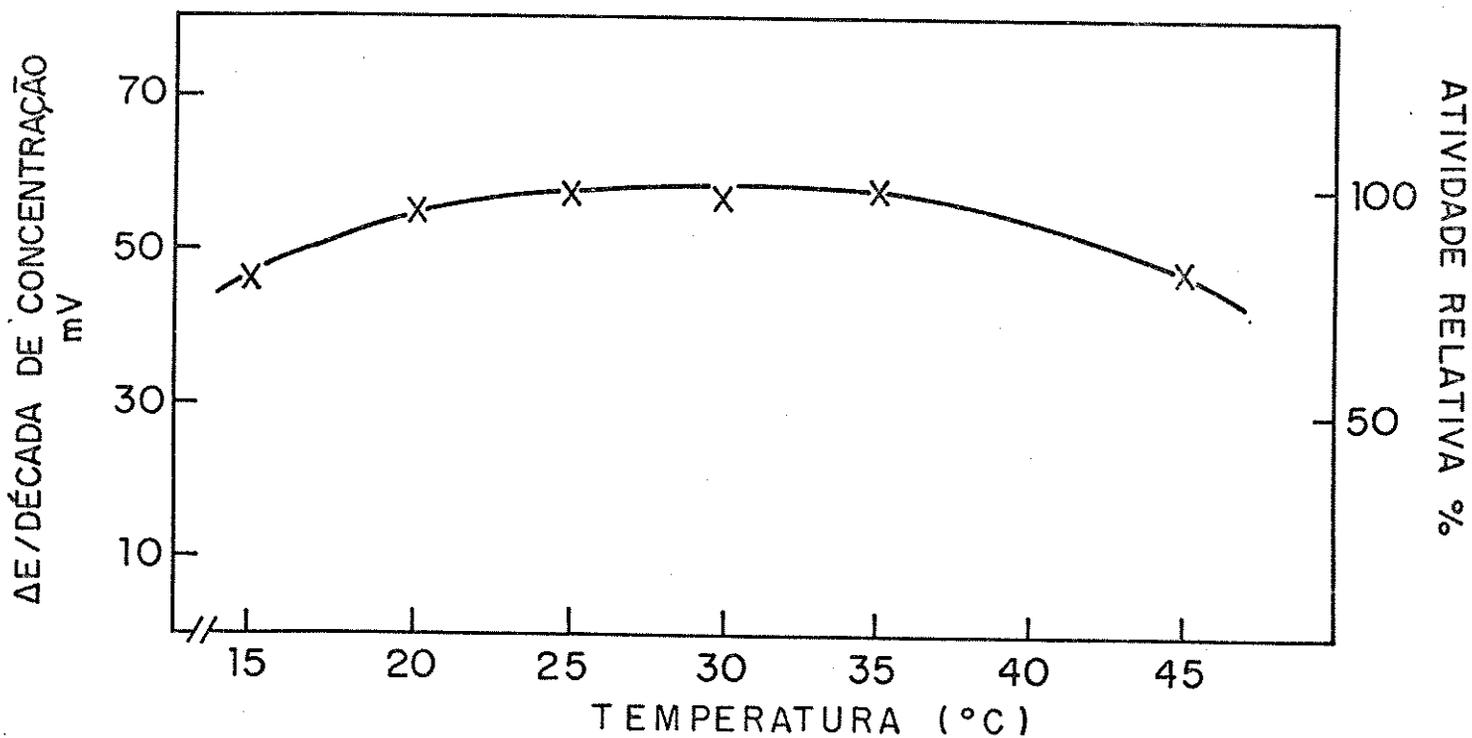


Figura 21- Estudo do efeito da temperatura da enzima (*Canvalia marítima*) imobilizada com glutaraldeído, na resposta do eletrodo enzimático. Tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0.

### 3. EFEITO DO pH

O tipo e a concentração do tampão são importantes quando se otimiza a resposta dos biossensores. O efeito do pH é apresentado nas figuras 22 e 23, para o biossensor contendo a urease (Canavalia marítima) imobilizada. A concentração 0,2 M levou-a respostas mais rápidas em relação à 0,1M para o eletrodo II. Este fato pode ser explicado provavelmente pela mudança de pH na superfície do biossensor, uma vez que a reação é favorecida pelo aumento da força iônica a qual desloca a reação para a formação dos produtos.

As curvas para a urease até então estudadas mostram que o tipo de ambiente iônico no qual se encontra a enzima influencia na atividade e no pH ótimo. Uma variação de pH pode ocasionar muitas modificações ao nível do sensor base, neste caso o eletrodo de amônia. A taxa de concentração amônio/amônia deve ser baixa em meio ácido.

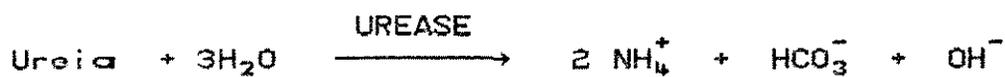
A atividade da urease é consideravelmente reduzida a valores de pH elevado. Desvios nas curvas do estudo da influência do pH são eliminados quando se aumenta a capacidade do tampão de 0,1M para 0,2M.

O pH do tampão usado afeta várias características do eletrodo, como:

- a) porcentagem de transformação de  $\text{NH}_4^+$  para  $\text{NH}_3$
- b) velocidade de transformação para  $\text{NH}_3$
- c) atividade enzimática.

Em pH abaixo de 7,0 a transformação da ureia não é completa. Alguns tampões são usados para a urease como por exemplo citrato pH 6,7, acetato pH 6,3, fosfato pH 7,3 e Tris-HCl pH 7,0 e 8,0.

A hidrólise da ureia processa-se via carbamato de amônio que se ioniza em ions amônio e bicarbonato. O efeito da capacidade do tampão na resposta do eletrodo de amônia, para determinação de uréia, foi estudado por Anfalti et alii [132] e Paspatalhopoulos e Rechnitz [133] registrando respostas super-nerstianas. Estas respostas não usuais podem ser explicadas devido a um aumento do pH na camada enzimática que afeta o equilíbrio  $\text{NH}_3 \rightleftharpoons \text{NH}_4^+$  como resultado da reação enzimática. Em pH 7,0 ocorre a formação de ions  $\text{OH}^-$ , de acordo com a equação abaixo:



O uso de um tampão com maior capacidade tamponante, elimina a resposta super-nerstiana, para concentrações superiores a  $5 \times 10^{-3} \text{M}$  de uréia.

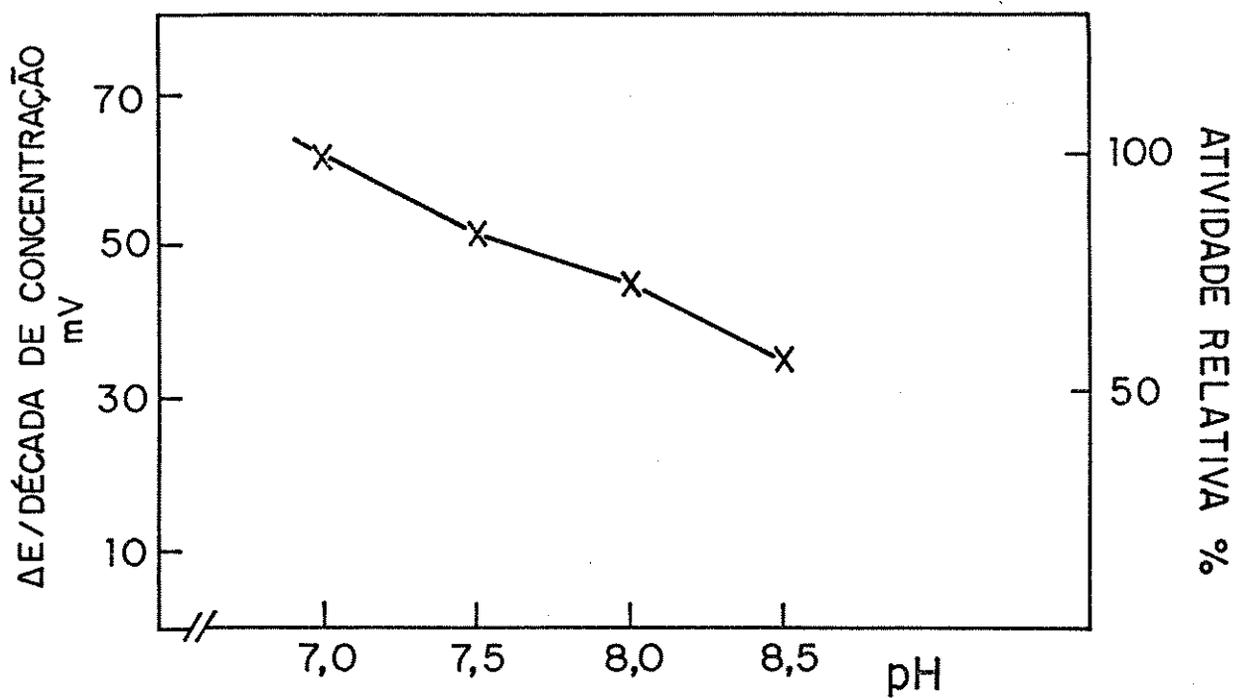


Figura 22- Estudo do efeito do pH da enzima (*Canvalia marítima*) imobilizada em PVC, na resposta do eletrodo enzimático. Temperatura  $25 \pm 0,2$  °C tampão Tris-HCl 0,1M .

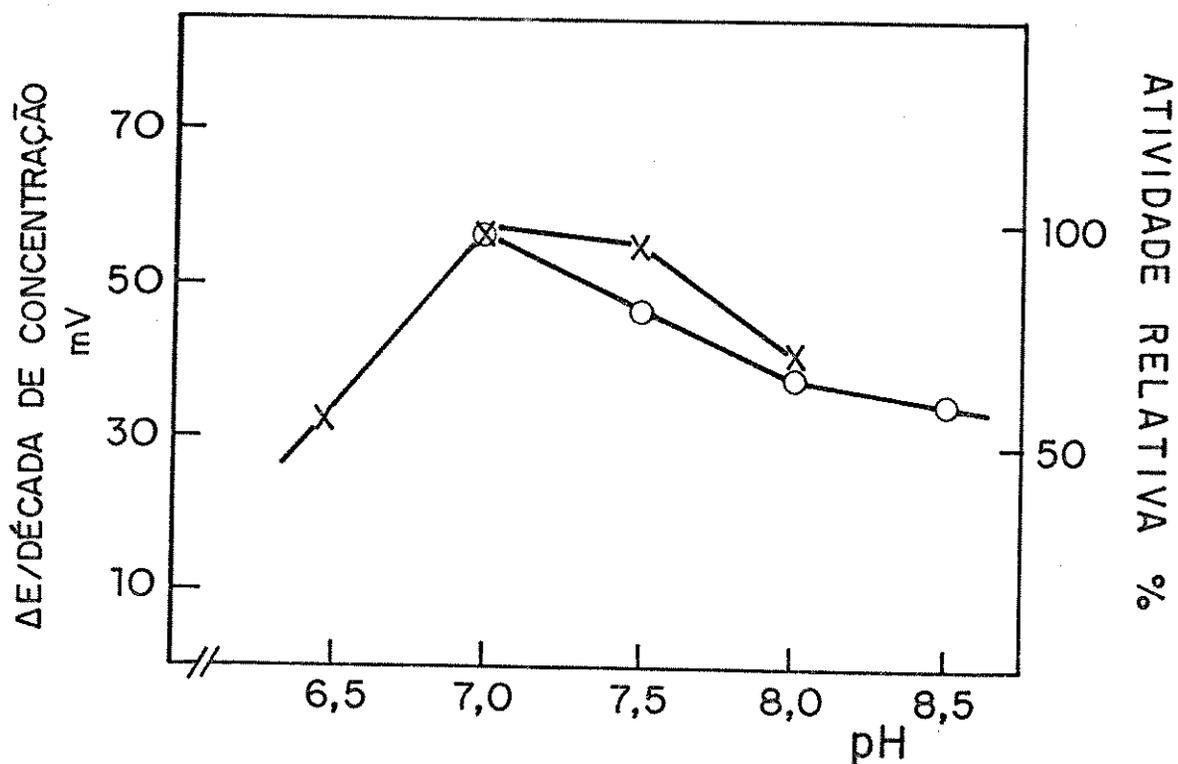


Figura 23- Estudo do efeito do pH da enzima (*Canvalia marítima*) imobilizada com glutaraldeído, na resposta do eletrodo enzimático. Temperatura  $25 \pm 0,2$  °C; O- Tampão Tris-HCl 0,2M; x- Tampão fosfato 0,1M.

#### 4. TEMPO DE RESPOSTA

Os eletrodos I e II apresentam um tempo de resposta de 10 minutos para faixa de concentração de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  M de uréia conforme mostram as figuras 24 e 25. Para estes eletrodos, com a enzima imobilizada houve um aumento de aproximadamente 50% no tempo de resposta em relação a enzima em suspensão.

A velocidade de resposta do eletrodo de amônia é proporcional à amônia produzida através da elevação de pH.

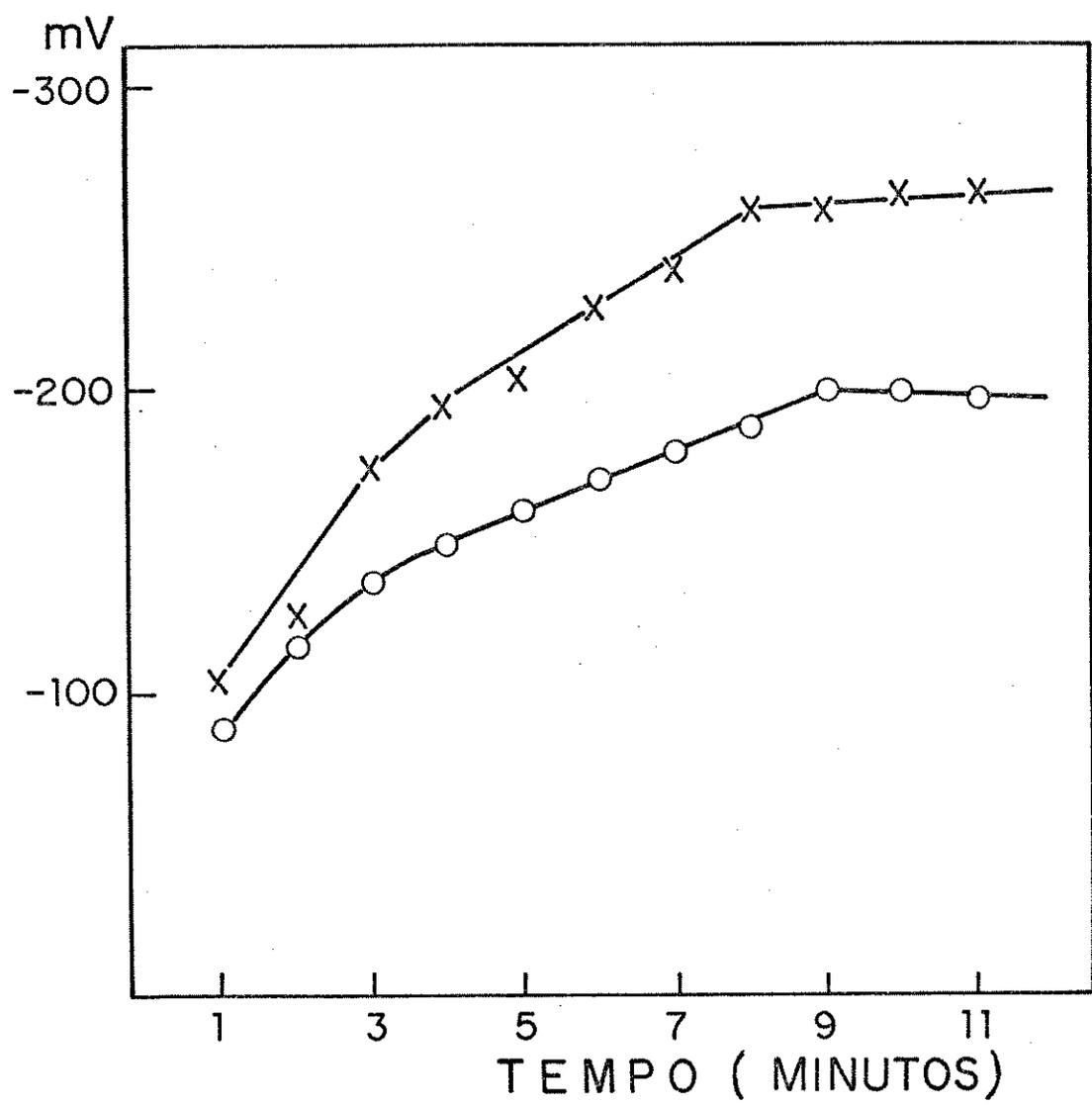


Figura 24- Estudo do efeito do tempo de resposta, para o eletrodo com urease (*Canavalia maritima*) imobilizada em PVC. Temperatura  $25 \pm 0,2$  °C tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0. Concentração de uréia : o-  $4,98 \times 10^{-4} M$ ; x-  $2,80 \times 10^{-3} M$ . Eletrodo sensível a amônia

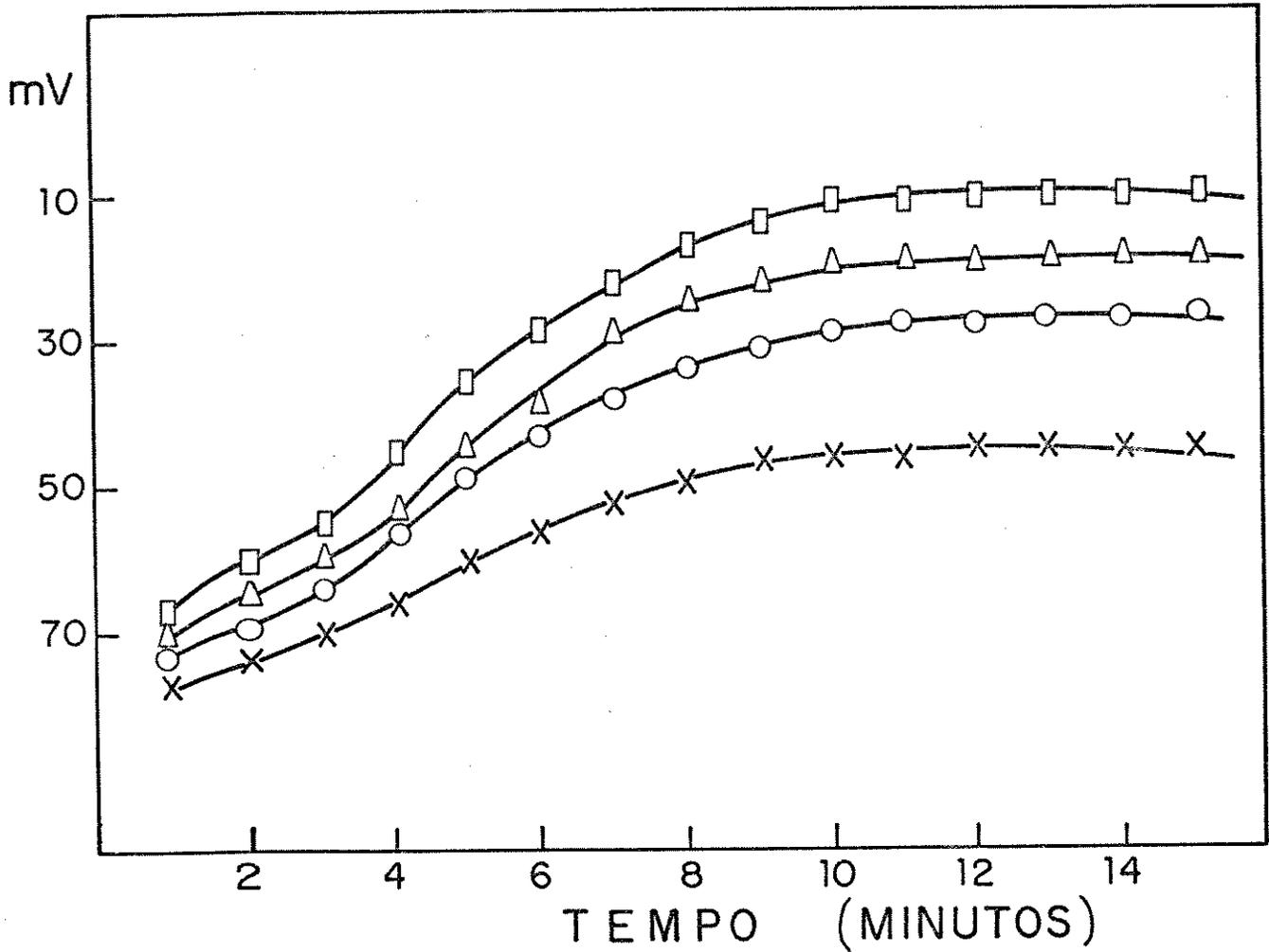


Figura 25- Estudo do efeito do tempo de resposta no enzimático eletrodo, com urease (*Canavalia marítima*) immobilizada com glutaraldeído. Temperatura  $25 \pm 0,2$  °C tampão Tris-HCl 0,2M pH 7,0. Concentração de uréia : x-  $9,90 \times 10^{-4}$  M; o-  $1,96 \times 10^{-3}$  M; Δ-  $2,91 \times 10^{-3}$  M; □-  $4,76 \times 10^{-3}$  M.

## 5. ESTABILIDADE OPERACIONAL E AO ARMAZENAMENTO

Para determinar a estabilidade operacional da urease imobilizada em PVC e com glutaraldeído, traçaram-se curvas de calibração em intervalos de tempo variados. O coeficiente angular das curvas permaneceu aproximadamente constante por 16 dias para a imobilização em PVC e 100 dias para a imobilização por ligação covalente, indicando que não houve perda de atividade neste período (figuras 26 e 27).

A explicação para perda da atividade é atribuída a lixiviação ou seja a membrana sofre um processo de desprendimento da enzima imobilizada.

Na figura 28 são apresentados os resultados da estabilidade ao armazenamento para o eletrodo imobilizado com glutaraldeído. O eletrodo foi mantido em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,0.

Pode-se constatar que ocorre apenas uma pequena perda de atividade, no período de 96 dias

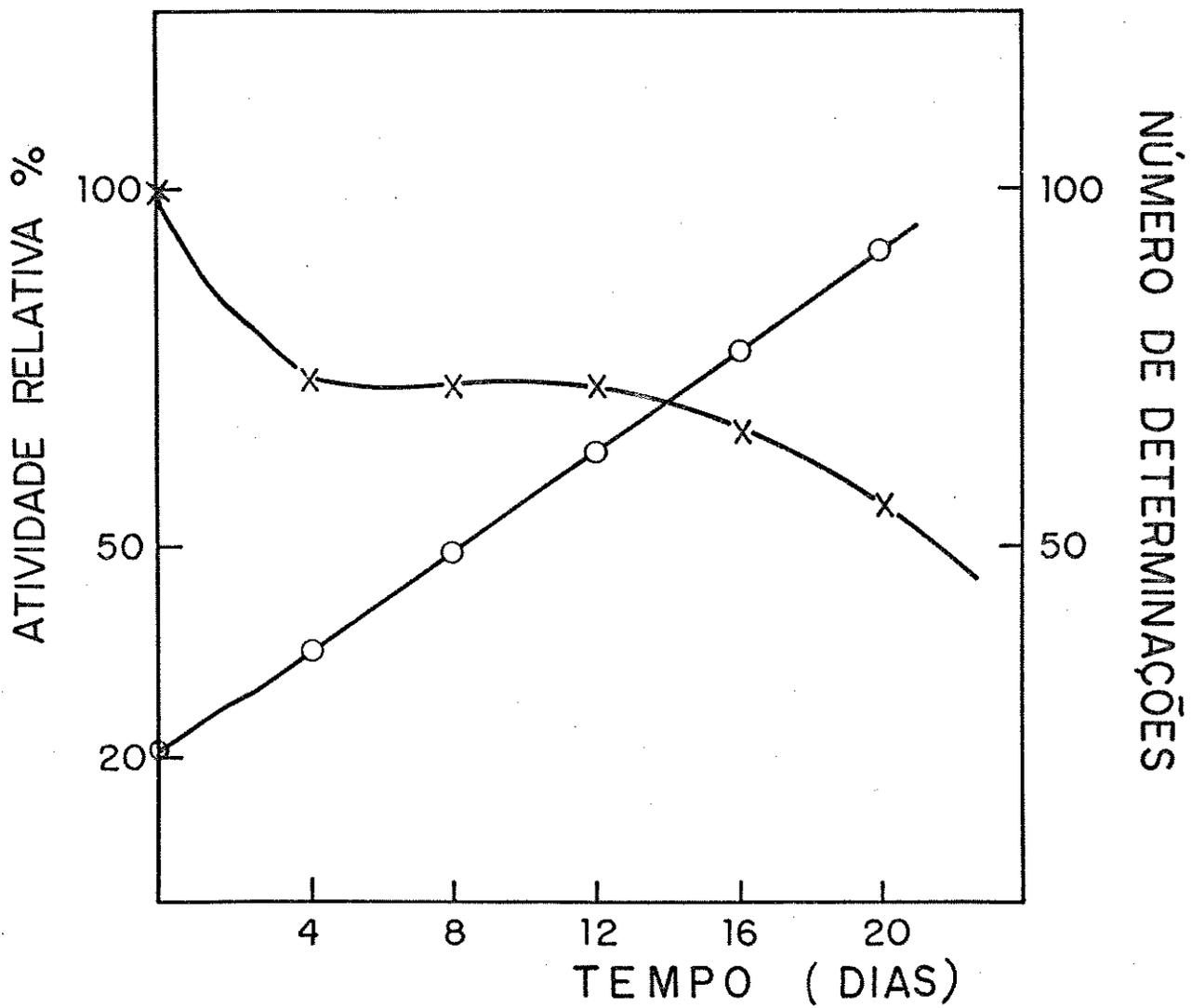


Figura 26- Estudo da estabilidade operacional do eletrodo, com urease (*Canavalia maritima*) imobilizada em PVC. Temperatura  $25 \pm 0,2$  °C tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0. O- número de determinações; x- atividade relativa. Eletrodo sensível a amônia.

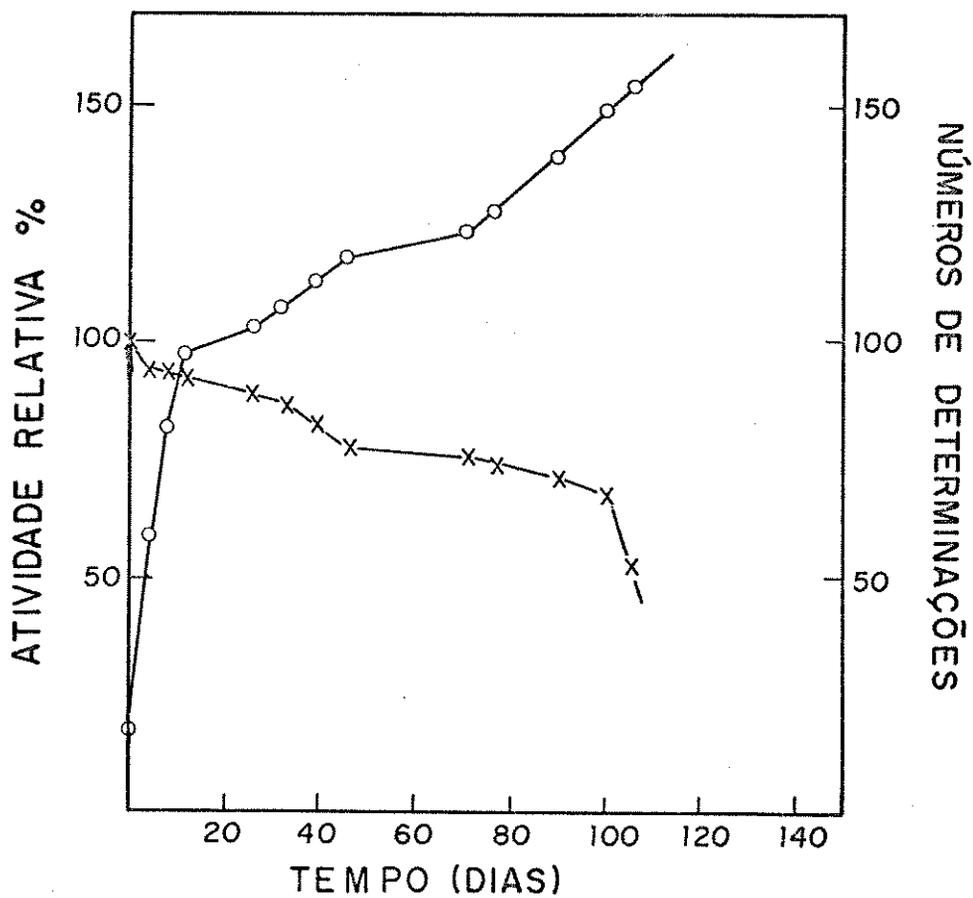


Figura 27- Estudo da estabilidade operacional do eletrodo enzimático, com urease (*Canavalia marítima*) imobilizada com glutaraldeído. Temperatura  $25 \pm 0,2$  °C tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0. O- número de determinações; x- atividade relativa. Eletrodo sensível a amônia.

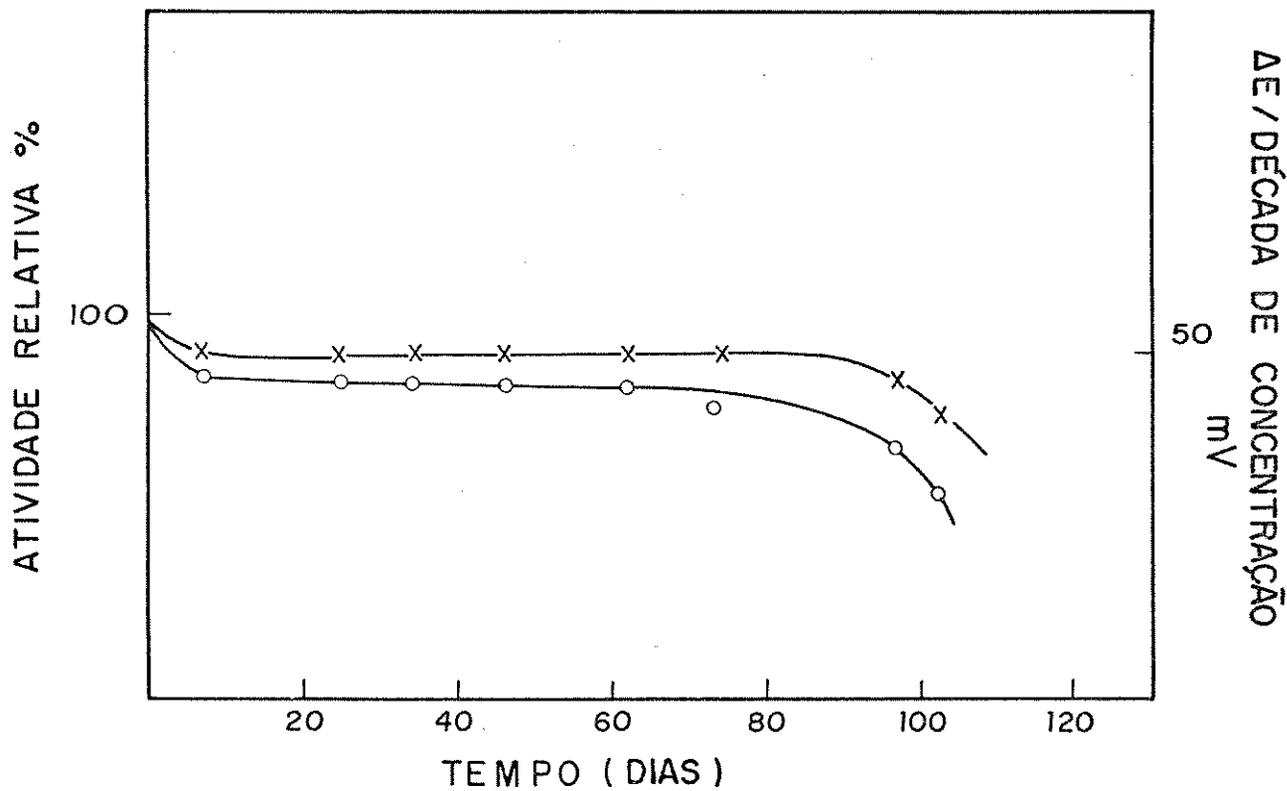


Figura 28- Estudo da estabilidade ao armazenamento do eletrodo, com urease (*Canavalia marítima*) imobilizada com glutaraldeído. Temperaturas : -o-  $25 \pm 0,2$  °C e -x-  $4,0 \pm 0,2$  °C, estocado em tampão Tris-HCl 0,2M, pH 7,0.

## 6. DETERMINAÇÃO DE $K_m$ E $V_{max}$

Quando uma enzima é imobilizada observa-se um aumento na constante de Michaelis-Menten. Este aumento é devido geralmente à carga no substrato e no suporte, efeito de diluição, mudança na configuração terciária.

Construindo-se o gráfico de Lineweaver-Burk obteve-se os seguintes resultados: coeficiente angular de 5,5404, intercepção do eixo do y de 1,4979 e coeficiente de correlação de 0,9986 para a enzima imobilizada com glutaraldeído; o  $K_m$  determinado é 3,70mM e  $V_{max}$  0,688  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$  (figura 29).

Para a enzima em suspensão,  $K_m = 2,80 \text{ mM}$  e  $V_{max} = 2,47 \mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$  (figura 30).

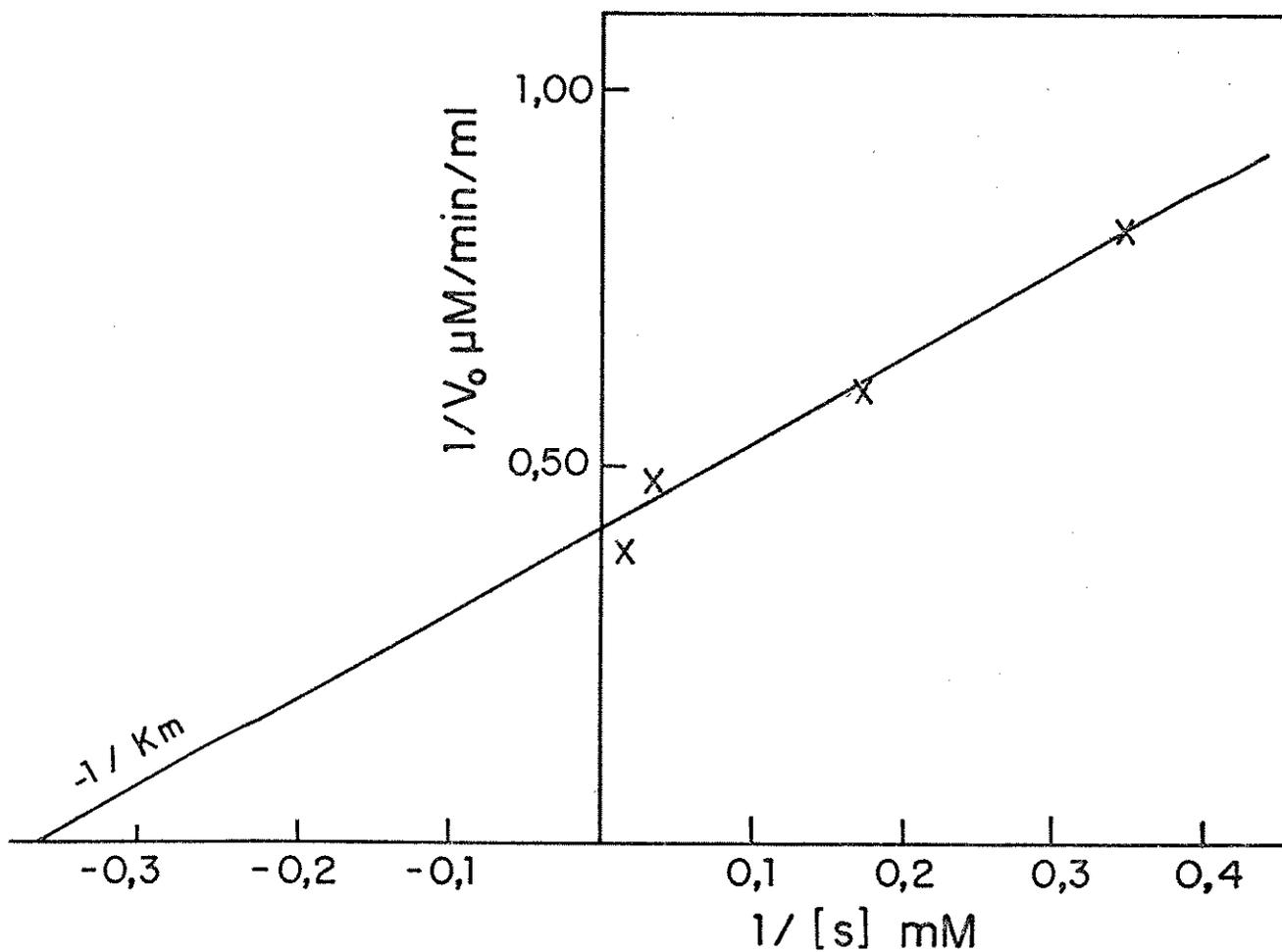


Figura 29- Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação de  $K_m$  e  $V_{max}$ , com urease (*Canavalia maritima*) em suspensão. Temperatura  $25 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$  ; tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0. Eletrodo sensível a amônia.

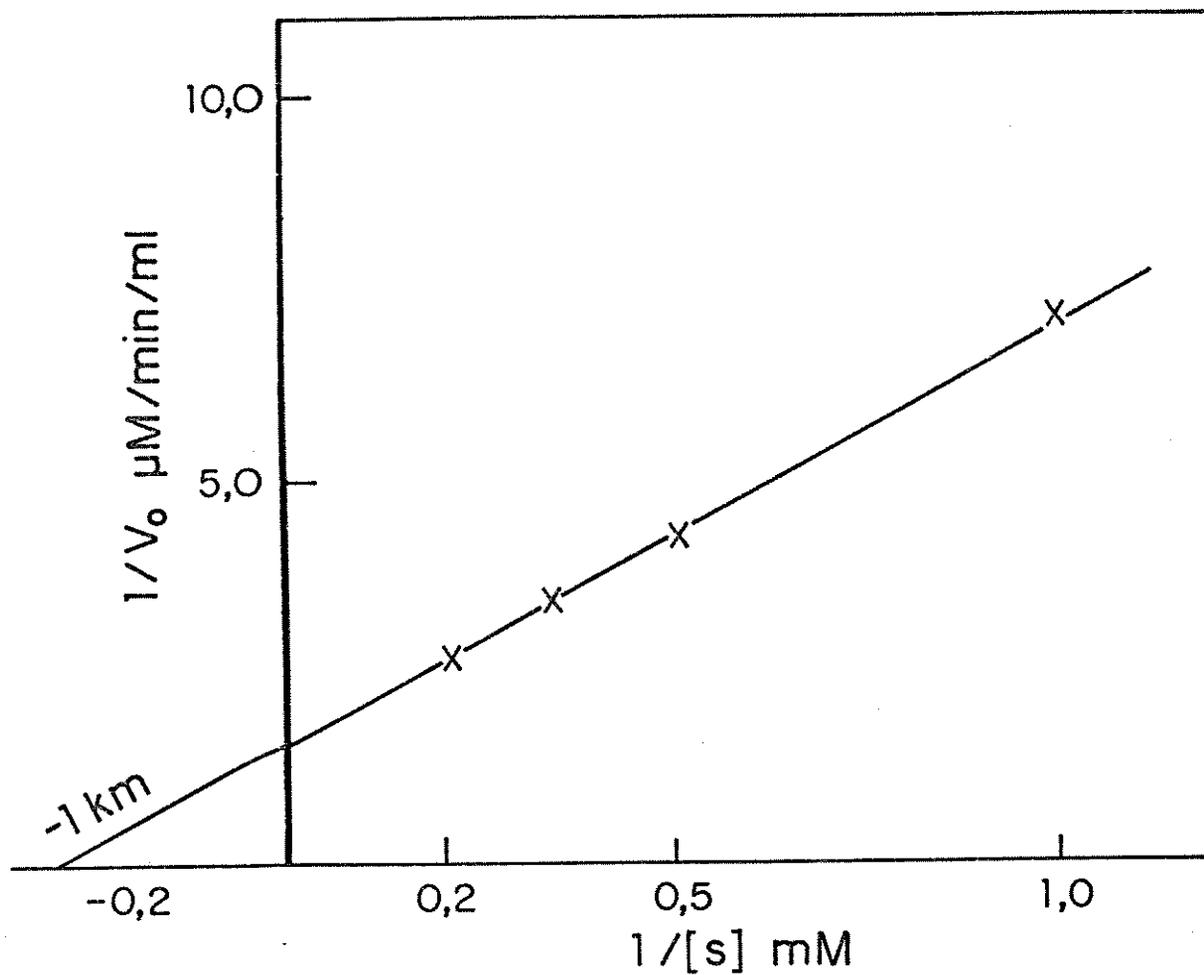


Figura 30- Gráfico de Lineweaver Burk para determinação de  $K_m$  e  $V_{max}$ , com urease (*Canavalia marítima*) imobilizada com glutaraldeído. Temperatura  $25 \pm 0,2$  °C, tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0. Eletrodo sensível a amônia.

## CAPÍTULO IX

# APLICAÇÃO ANALÍTICA DOS ELETRODOS CONSTRUÍDOS

### A. INTRODUÇÃO

Escolheu-se a determinação de uréia em soro para se avaliar o desempenho analítico do eletrodo enzimático, devido a sua importância em análises clínicas.

Utilizou-se os eletrodos I e II para determinação do teor de uréia em soro sanguíneo. A tabela VI apresenta as características dos dois eletrodos.

Tabela VI- Características dos eletrodos I e II

Eletrodo	* Quantidade de urease (mg)	Espessura da membrana (mm)	Diâmetro da membrana (mm)
I	10	0,50	0,80
II	10	0,60	0,80

\* Canavalia marítima

## B. PARTE EXPERIMENTAL

### 1. REAGENTES E MATERIAIS

Foram utilizadas solução de referência de soro sanguíneo da Boehringer e amostras de soro sanguíneo de pacientes do Hospital Osvaldo Cruz - PE. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

As medidas de potencial foram realizadas com potenciômetro Micronal, modelo B - 375, em células de vidro de capacidade 10 ml, termostatizada em banho Thermostat U - 10 e utilizando-se eletrodo sensível a amônia da Universal Sensors.

### 2. PROCEDIMENTO ANALÍTICO

#### 2.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Transferiu-se 2,0 ml da solução contendo EDTA 0,1  $\mu$ M, NaCl 0,1 M e tampões Tris-HCl, pH 7,0, com concentrações 0,1M e 0,2M, respectivamente para os eletrodos I e II, para célula de vidro de 10 mL de capacidade.

Termostatizou-se a solução à  $25 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  e introduziram-se os eletrodos enzimáticos. Após estabilização do potencial adicionou-se solução de uréia para se obter um intervalo de concentração de  $10^{-2}$  à  $10^{-4}$  M e depois de 10 minutos efetuou-se a leitura de potencial.

Curvas de calibração foram traçadas com soluções padrões de uréia.

## 2.2 DETERMINAÇÃO DE UREIA EM AMOSTRAS REAIS DE SORO SANGUÍNEO

Para determinação de uréia em amostras de soro sanguíneo utilizou-se o mesmo procedimento da curva de calibração, substituindo-se a solução padrão de uréia pelo soro de pacientes do Hospital Osvaldo Cruz, ou o soro controle da Boehringer.

### C. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados das análises das amostras reais e padrões com os eletrodos I e II, foram comparados com o método espectrofotométrico [27].

As análises com os eletrodos I e II foram realizadas através de curvas de calibração para uréia em concentrações que variaram de  $10^{-2}$  à  $10^{-4}$  M (figuras 31 e 32).

A avaliação do comportamento dos eletrodos indica que o sensor apresenta boa reprodutibilidade com coeficiente angular de 62,65 mV e 53,78 mV (tabelas VIII e X) para tempo de resposta de 10 minutos.

O comportamento super-nernstiano se deve a baixa capacidade do tampão. O eletrodo II apresentou erro relativo menor que o eletrodo I (tabela XIII e XIV)

As estimativas do desvio padrão foram calculadas utilizando-se amostras de soro controle da Boehringer (tabelas XI e XII).

Tabela VII- Curva de calibração para eletrodo enzimático I.  
 Volume da célula de medida 2,0ml tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,0, EDTA  
 0,1 $\mu$ M, NaCl 0,1M. Resultados expressos utilizando-se teste Q para 95%  
 de confiança [184].

[ureia] mM	-log[ureia]	- E (mV)					$\bar{x}$
2,35	2,63	50,3	51,4	49,6	52,0	51,8	- 51,0
4,98	2,30	80,6	81,2	81,6	80,8	82,1	- 81,3
7,41	2,13	90,2	90,1	90,0	90,4	90,2	- 90,2
9,78	2,01	100,3	100,6	100,6	100,3	100,3	- 100,4
14,4	1,84	110,3	110,6	110,0	110,3	110,3	- 110,3
23,5	1,63	121,4	121,6	121,2	121,3	121,7	- 121,4
31,9	1,49	130,4	130,6	130,8	130,2	130,0	- 130,4
43,6	1,36	141,3	141,2	141,8	141,0	141,2	- 141,3
74,1	1,13	145,1	145,9	145,0	145,2	145,8	- 145,4
97,8	1,00	150,2	150,3	150,9	149,9	150,3	- 150,3

Tabela VIII- Parâmetros obtidos apartir da tabela VII.

n	Limite Nerstiano(mM)	$-E^{\circ}$ (mV)	S (mV/pNH <sub>3</sub> )	$r^2$
01	5,24	225,64	63,09	0,9983
02	5,01	225,19	62,73	0,9982
03	5,24	225,50	62,89	0,9977
04	5,24	224,65	62,56	0,9984
05	5,24	223,71	61,93	0,9980
$\bar{x}$	5,01	224,87	62,60	0,9982

$E^{\circ}$  : Potencial padrão condicional = coeficiente da curva de calibração.

S : Coeficiente angular da curva de calibração

$r^2$  : coeficiente de correlação

n : número da determinação

$\bar{x}$  : média dos valores

Tabela IX- Curva de calibração para o eletrodo II. Volume de célula de medida 2,0ml de tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0, EDTA 0,1 $\mu$ M, NaCl 0,1 M. Resultados expressos utilizando teste Q para 95% de confiança.

[uréia] (mM)	0,148	0,219	0,498	0,990	1,48	2,91	4,76	6,98	9,50	13,4
-log C	3,83	3,60	3,30	3,00	2,83	2,54	2,30	2,16	2,02	1,87
E (mV)	95,3	75,2	49,9	32,9	23,2	6,7	-7,1	-14,1	-23,5	-30,2
	97,2	75,3	46,3	30,2	21,7	5,2	-6,2	-15,8	-22,6	-29,0
	97,2	76,4	46,6	31,2	22,3	6,2	-5,1	-12,8	-22,5	-28,9
	96,3	75,8	45,6	31,9	21,7	6,8	-4,1	-14,1	-21,3	-29,1
	97,2	75,3	47,6	32,0	22,3	7,8	-5,7	-12,9	-21,3	-29,1
	97,3	75,2	47,8	31,6	23,1	6,4	-5,7	-12,9	-21,3	-29,1
	96,2	75,8	44,2	31,2	22,9	5,3	-8,6	-15,1	-22,5	-28,1
	96,3	75,9	48,9	31,6	25,8	8,4	-5,7	-12,3	-21,7	-29,0
	96,4	76,2	43,1	31,4	24,5	7,6	-5,6	-12,8	-22,6	-28,0
$\bar{x}$	96,6	75,7	46,7	31,6	23,1	6,7	-6,0	-13,6	-22,1	-28,9

Tabela X- Parâmetros obtido apartir da tabela IX

n	Limite Nerstiano $\times 10^{-4}$ M	$E^{\circ}$ (mV)	S (mV/pNH <sub>3</sub> )	$r^2$
01	5,75	-137,85	56,91	0,9999
02	4,57	-131,41	53,92	0,9997
03	4,57	-128,50	53,19	0,9994
04	4,57	-125,98	52,21	0,9992
05	4,57	-128,89	53,74	0,9999
06	4,57	-129,47	53,74	0,9999
07	4,57	-130,72	53,58	0,9987
08	4,57	-131,12	54,70	0,9989
09	4,57	-128,13	53,29	0,9971
$\bar{x}$	5,01	-129,95	53,78	0,9997

$E^{\circ}$  : Potencial padrão condicional = coeficiente da curva de calibração.

S : Coeficiente angular da curva de calibração

$r^2$  : coeficiente de correlação

n : número da determinação

$\bar{x}$  : média dos valores

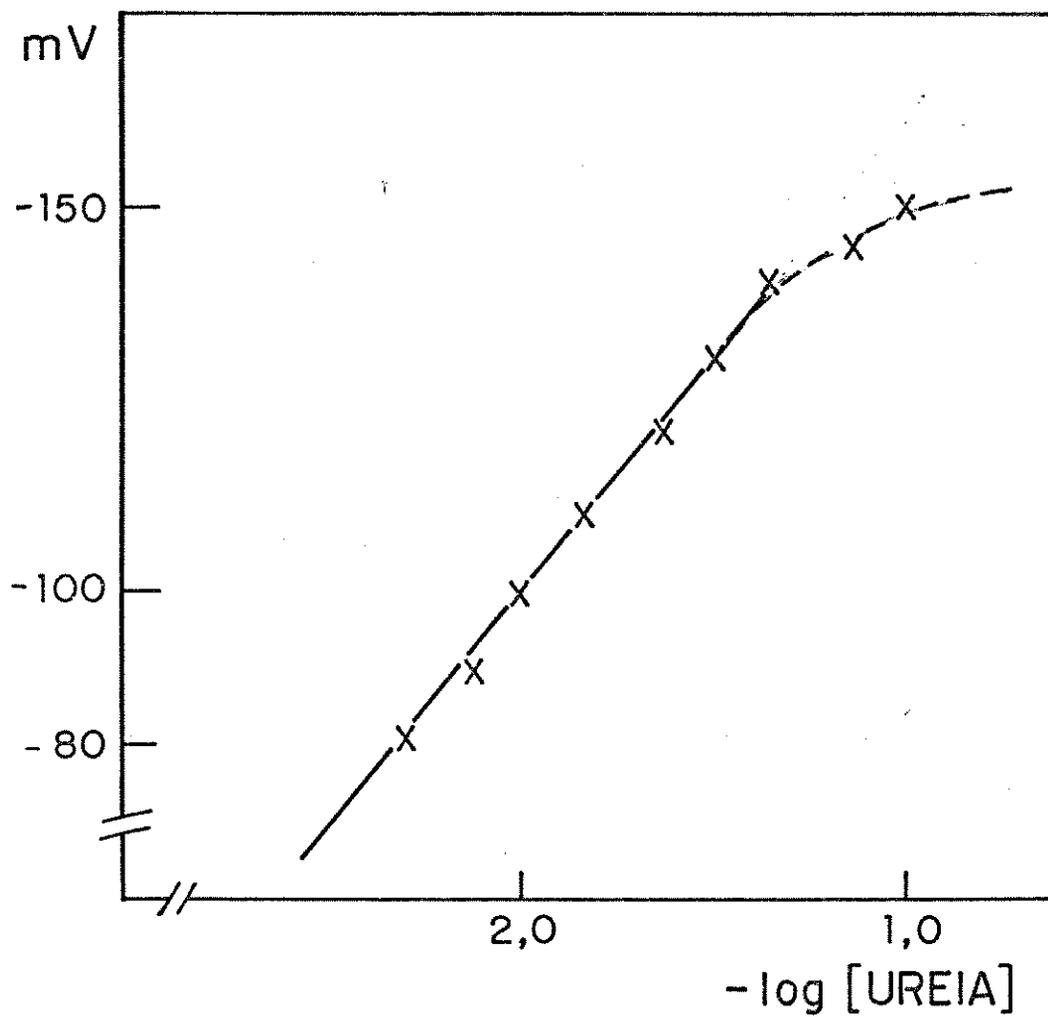


Figura 31- Curva de calibração para eletrodo enzimático, com urease (*Canavalia marítima*) imobilizada em PVC. Temperatura  $25 \pm 0,2$  °C, tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,0. Eletrodo sensível a amônia.

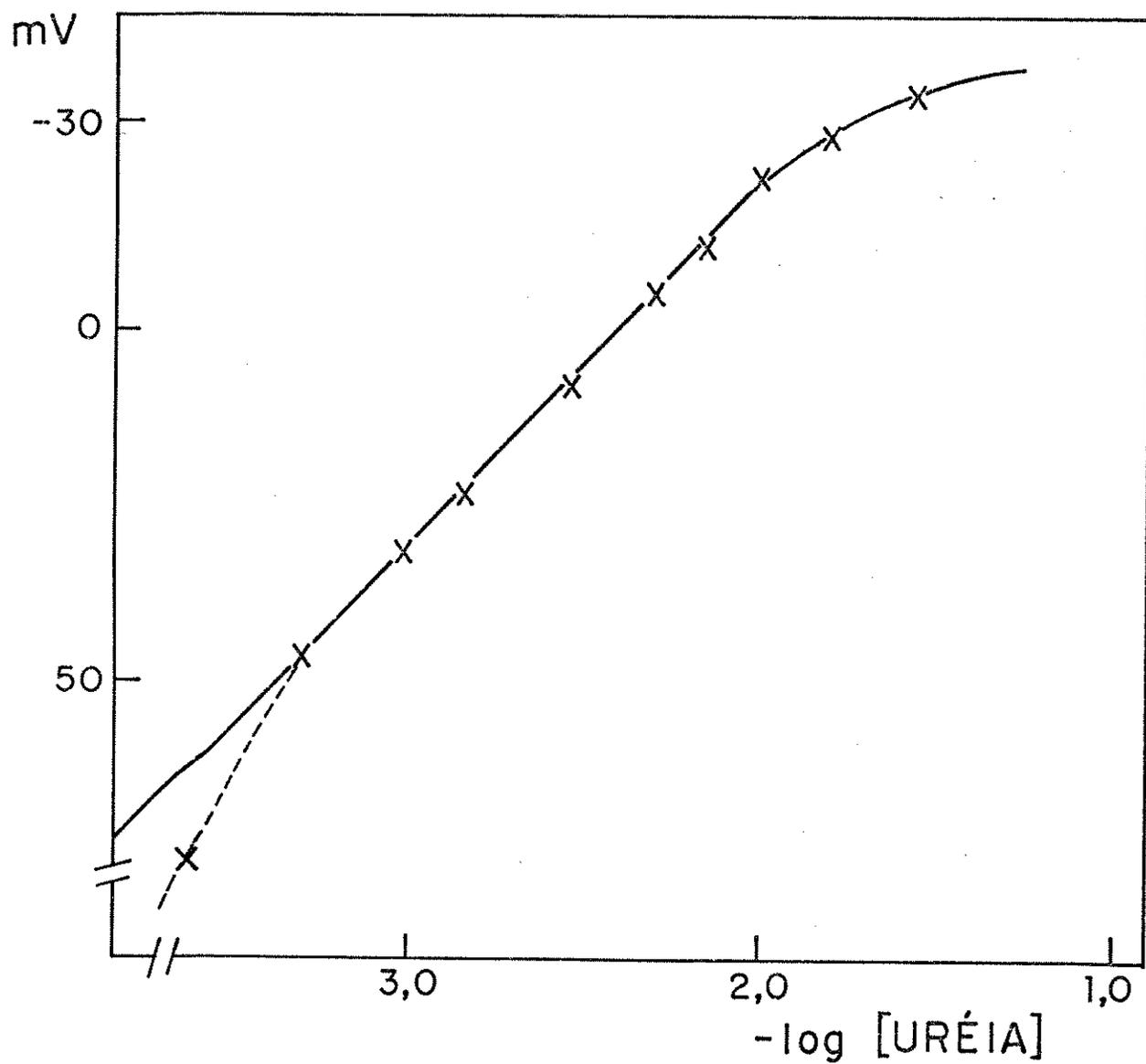


Figura 32- Curva de calibração para eletrodo enzimático, com urease (*Canavalia marítima*) imobilizada com glutaraldeído. Temperatura  $25 \pm 0,2$  °C , tampão Tris-HCl 0,2M, pH 7,0. Eletrodo sensível a amônia.

Tabela XI - Cálculo da estimativa do desvio padrão para a determinação de uréia em soro controle da Boehringer com eletrodo I.

[uréia] mM	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$
8,9	- 0,5	0,25
9,1	- 0,3	0,09
9,8	+ 0,4	0,16
10,0	+ 0,6	0,36
10,2	+ 0,8	0,64

$$\bar{X} = 9,4 \text{ mM} \quad s = 0,61$$

Tabela XII - Cálculo da estimativa do desvio padrão para a determinação de ureia em soro controle da Boehringer com eletrodo II.

[uréia] mM	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$
9,0	- 0,4	0,16
9,1	- 0,3	0,09
10,1	+ 0,7	0,49
9,3	- 0,1	0,02
10,0	+ 0,6	0,36

$$\bar{X} = 9,4 \text{ mM} \quad s = 0,53$$

Tabela XIII- Determinação de uréia em soro humano, utilizando métodos espectrofotométrico e potenciométrico (eletrodo enzimático com urease imobilizada em PVC)

Número da amostra	Método Potenciométrico [uréia] mM	Método espectrofotométrico [uréia] mM	Er %
1	35,9	35,0	-2,6
2	7,8	8,0	-2,5
3	3,0	3,3	-10,0
4	2,7	2,5	+8,0
5	4,2	4,3	-2,3
soro controle	9,6	9,4	+2,1

Todos os valores representam a média de 3 determinações.

Tabela XIV - Determinação de uréia em soro humano, utilizando métodos espectrofotométrico e potenciométrico (eletrodo enzimático com urease imobilizada em glutaraldeído)

Número da amostra	Método Potenciométrico [uréia] mM	Método espectrofotométrico [uréia] mM	Er %
1	36,5	35,0	+4,3
2	7,5	8,0	-6,3
3	3,4	3,3	+3,0
4	6,8	6,7	+1,5
5	2,5	2,4	+4,2
6	6,7	6,5	+3,1
7	4,3	4,1	+4,9
8	26,2	24,9	+5,2
9	25,4	25,0	+1,6
10	31,2	30,6	+2,0
soro controle	9,5	9,4	+1,1

#### D. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Os estudos sobre a atividade das leguminosas, evidenciaram que a *Canavalia marítima* apresenta maiores potencialidades para utilização analítica. A atividade demonstra que a espécie é sem dúvida superior à daquela comercialmente explorada (tabela IV e V). Evidentemente, a enzima na sua forma pura é a mais indicada. No entanto estes estudos mostraram que é possível utilizar a forma impura, obtida por simples trituração das sementes.

As condições experimentais de pH (7,0); tempo de reação (5 à 10 minutos); temperatura ( $25,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ); tampão Tris-HCl (0,1 e 0,2M) foram basicamente as mesmas para enzima em suspensão e imobilizada, significando que não houve alteração fundamental na sua estrutura terciária. Apenas no caso da imobilização com glutaraldeído, notou-se que a concentração do tampão deve ser superior àquela exigida pelos outros procedimentos.

A imobilização química mostrou-se mais adequada, permitindo a realização de cerca de 150 análises no prazo de 100 dias, enquanto que a imobilização por membranas com PVC apresentou estabilidade operacional de 77 análises em 16 dias.

A enzima imobilizada com glutaraldeído armazenada à temperatura ambiente, apresentou 66% de atividade e quando à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , 83,6 % em 96 dias. A boa estabilidade e durabilidade pode ser atribuída em parte à adição de EDTA à solução, pois o mesmo atua como estabilizador através da complexação de traços de metais que poderiam inibir a atividade da urease.

A determinação de  $K_m$  (3,70mM) e  $V_{max}$  ( $0,688\mu\text{M}/\text{min.}/\text{ml}$ ) para

a enzima imobilizada com glutaraldeído são comparáveis àquelas encontradas na literatura para a enzima pura : Km 2,69 mM e Vmax 0,128  $\mu$ M/min./ml.

A aplicação do eletrodo enzimática na determinação de uréia em soro sanguíneo confirmou a potencialidade da utilização da leguminosa *Canavalia marítima* como fonte alternativa de urease.

Finalmente deve-se ressaltar que a *Canavalia marítima* surge como importante fonte vegetal de uma enzima de grande importância biológica e industrial, podendo surpreender inclusive a falta do produto importado.

O biossensor construído com a enzima na forma bruta mostrou-se adequado e suficiente para o desenvolvimento de métodos rápidos e simples, de baixo custo por análise.

Em vista dos resultados obtidos dever-se-à futuramente automatizar as análises incorporando as sementes "in natura" num sistema por injeção em fluxo.

Com os conhecimentos adquiridos pretende-se testar também, outras fontes abundantes no Brasil como pétalas de flores, semente de melancia e outros tipos de leguminosas.

## BIBLIOGRAFIA

- 1- Della Vida, B.L. e Lombrardi, L.; Diag. Med. 8, 247 (1963)
- 2- Fitipaldi, E.V.; Manuale de Analise Chimica delle urine.,  
Ed. Pellerano del Guadio, Napoli (1951)
- 3- Bancroft, J.; J. Phisiol., 37, 12 (1908)
- 4- Warburg, O.; Biochem. J., 152, 51 (1924)
- 5- Umbreit, W. W.; Burris, R. H. e Stauffer, J. F.; Manometric  
Technique, Burgess Publishing Co., Mineapolis (1945)
- 6- Dixon, M., Manometric Methods, Cambridge University Press,  
Cambridge.(1951)
- 7- Van Slyke, D.D. e Hiller, A.; J. Biol. Chim., 102, 499 (1933)
- 8- Conway, E. J., Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, Ed.  
4ed, pp. 163, Crosby Leuckuwood, London (1957)
- 9- Fosse, R. e Robyn, A.; François, F.; Compt. Rend. Acad., 159,  
367 (1914)
- 10- Ambard, L. e Schmid, F.; Bull Soc. Chim. Biol., 12, 231  
(1930)

- 11- Beattie, F.; Biochem. J., 22, 711 (1928)
- 12- Folin, O.; J. Biol. Chem., 14, 283 (1913)
- 13- Bonitz, K. e Fuhr, J.; Ser Gegenwart., 3, 102 (1963)
- 14- Parmense, A., Sez., 1, (5), 557 (1966)
- 15- Fearon, W.R.; Biochem. J., 33, 902 (1939)
- 16- Beale, R.N. e Croft, D.; J. Clin. Path., 14, 418 (1961)
- 17- Caraway, W. e Fanger, H.; Amer. J. Clin. Path., 25, 357  
(1955)
- 18- Neves, G.V. e Pike, R.L.; Analyst Biochem., 2, 174 (1961)
- 19- Coulomb, B.J. e Favreau, L.; Clin. Chem., 9, 102 (1963)
- 20- Golaz, F., Les Microdosages de l'urée dans le sang., Le Roux  
et Co., Strasbourg (1929)
- 21- Manzini, C.; Minerva Med., 57, 385 (1966)
- 22- Peters, J.P. e Van Silyke, D.D., Quantitative Clinical  
Chemistry interpretation, vol 1., Williams and Wilkins  
Co., Baltimore, (1932)

- 23- Südhof, H. e Tishendorf, F.W.; Klin. Wschr., 4, 208 (1962)
- 24- Ryland, M.E.; Clin. Chem., 10, 406 (1964)
- 25- Nathan, D.G. e Rodkey, F.; J. Lab. Clin. Med., 49, 770 (1957)
- 26- Berthelott, M.; Repert. Chim. App., 1, 284 (1859)
- 27- Chaney, A.L. e Marbach, E.P.; Clin. Chem., 8, 130 (1960)
- 28- Thomas, P.; Bull. Soc. Chim. France, 11, 796 (1912)
- 29- Borsook, H.; J. Biol. Chim., 11, 481 (1935)
- 30- Russel, J.A.; J. Biol. Chem., 156, 457 (1944)
- 31- Fleury, P. e Eberhard, R.; J. Biol. Chem., 16, 65 (1958)
- 32- Muftic, M.K.; Nature, 201, 622 (1964)
- 33- Logsdon, E.E.; Ann. N. Y. Acad. Scic., 87, 801 (1960)
- 34- Hanss, M. e Rey, A.; Biochim. Biophys. Acta, 227, 630 (1971)
- 35- Guilbault, G.G. e Hrabankova, E.; Ann. Biol. Chim., 52, 287  
(1970)

- 36- Guilbault, G.G.; Nagy, G. e Kuan, S.S.; Anal. Chim. Acta. 67, 195 (1973)
- 37- Mascini, M. e Guilbault, G.G.; Anal. Chem., 49, 795 (1977)
- 38- Booker, H. e Haslan, J.; Anal. Chem., 46, 1054 (1975)
- 39- Rechnitz, G.A.; Science, 214, 287 (1981)
- 40- Guilbault, G.G. e Das, J.; Anal. Biochem., 33, 341 (1970)
- 41- Arnold, M.A. e Meyerhoff, M.E., Anal. Chem., 56, 20R (1984)
- 42- Davis, J.E.; Solski, R.L.; Glering, L.G. e Malhotra, S.;  
Anal. Chem., 55, 202R (1983)
- 43- Planche, J.; J. of Pharm., 6, 16 (1820)
- 44- Liebig, J.V. e Wöhler, F., Ann. Chem., 22, 1 (1837)
- 45- Fishman, M.M., Anal. Chem., 50, 261 (1978)
- 46- Bergmeyer, H.V., Methods in Enzymatic Analysis, Marcel Dekker, New York (1975)

- 47- Dyrssen, D.; Jagner, D. e Wengelin, F., Computer Calculation of Ionic Equilibrium and Titration Procedures, pp. 66-68, Almqvist and Wiksell, Stockholm (1962)
- 48- Guilbault, G.G., Enzymatic Methods of Analysis, Pergamon Press, Londres, (1969)
- 49- Tietz, N. W., Fundamentals of Clinical Chemistry, pp. 718-722, Ed. 2nd, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1977)
- 50- Brown, A.J.; J. Chem. Soc., 81, 373 (1970)
- 51- Laider, K.L., The Chemical Kinetic of Enzyme Action, Oxford University Press, London (1958)
- 52- Gray, C.J., Enzyme Catalyzed Reaction, Van Nostand Reinhold Co., New York (1972)
- 53- Phowman, K.M., Enzyme Kinetics Mc. Graw-Hill, New York (1972)
- 54- Michaelis, L. e Menten, M.L.; Biochem. Z., 49, 333 (1913)
- 55- Briggs, G.E. e Haldane, J.B.S.; Biochem. J., 19, 338 (1925)
- 56- Lineweaver, H. e Burk, D.J. J. Am. Chem. Soc., 56, 658 (1934)

- 57- Karmen, A.; J. Clin. Invest., 34, 134 (1955)
- 58- Henry, R.J.; Chiamori, N.; Golub, O.J. e Berkman, S.; Amer. J. Clin. Path., 34, 381 (1960)
- 59- Wroblewski, F. e Larue, J.S.; Proc. Soc. Med., 90, 210 (1955)
- 60- Wacker, W. E. C.; Ulmer, D.D. e Vallee, B.L.; J. Med., 255, 449 (1956)
- 61- Rosalki, S.B. e Wilkerson, J.H.; Nature, 188, 1110 (1960)
- 62- Oliver, I.T.; Biochem. J., 61, 116 (1955)
- 63- Rosalki, S.B.; J. Lab. Clin. Med., 61, 696 (1967)
- 64- Bessey, O.A.; Lowry, O.H. e Brock, M.J.; J. Biol. Chem., 164, 321 (1947)
- 65- Adler, E.; Gunther, G. e Plass, M.; Biochem. J., 33, 1038 (1939)
- 66- Baum, P. e Czok, R.; Biochem. Z., 332, 121 (1959)
- 67- Dixon, M. e Webb, E. C., Enzymes, pp. 81, Academic Press, New York (1958)

- 68- Boyer , P.D. , The Enzymes, Vol II, pp. 35, Academic Press, New York (1970)
- 69- Shaw, W.H.R. e Raval, D. N.; J. Am. Chem. Soc., 83 , 3184 (1961)
- 70- Ogren, L. e Johansson, G. ;Anal. Chim. Acta., 96, 1 (1978)
- 71- Nelson, J.M. e Griffin, E.G.; J. Am. Chem. Soc., 297, 1109 (1916)
- 72- Gruhofer, N. e Schleith, L.; J. Physcal. Chem., 279, 108-112 (1971)
- 73- Goldstein, L.; Levin, Y. e Katchalski, E., Water Insoluble Enzymes Derivatives and Artificial Enzymes Membranes, In Biochemical Aspect of Reaction on Solid Supports,pp. 1-78, G.R. Academic Press. Inc., New York (1971)
- 74- Manecke, G.; Cünzel, G. e Förster, H.J.; J. Polym. Sci., 30, 607 (1970)
- 75- Chibata, I. , Immobilized Enzyme Research and Development , John Willey & Sons, New York (1975)
- 76- Duran, G. e Monsan, P.,Les Enzymes. Production et Utilization Industrielles, Gauthier-Vellars, Paris (1982)

- 77- Guilbault, G.G. e Sadar, M.H., Techniques in Life Sciences, Elsevier, Amsterdam (1979)
- 78- Campbel, J. e Hornby, W.E., in Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins, Plenum Press, New York (1977)
- 79- Ruzicka, J. e Hansen, E.H.; Anal. Chim. Acta, 69, 129 (1974)
- 80- Shoifreen, D.A.; Harn, P.A.; Bowers, L.D. e Car, P.W.; Anal. Chem., 49, 1929 (1977)
- 81- Chang, T.M.S.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 4, 1531 (1961)
- 82- Lindau, G. e Rhodius, R.; Z. Physik Chem., A172, 321 (1935)
- 83- Hummel, J.P. e Anderson, B.S.; Arch. Biochem. Biophys., 112, 443 (1965)
- 84- Schuan, I.H. e Katchalski, E.; Ann. Rev. Biochem., 35, 873 (1966)
- 85- Vorobeveva, E.S. e Pollorak, O.M.; Vestn. Mosk. Univ. Khim., 21, 17 (1986)

- 85- Goldfeld, M.G.; Vorobeva, E. S. e Pollorak, O.M., Zh. Fiz. Khim., 40, 2594 (1966)
- 87- Gale, E.F.; Biochem. J., 38, 232 (1944)
- 88- Tosa, T.; Mori, T.; Fuse, N. e Chibata, I.; Biotechnolog. Bioeng., 9, 603 (1967)
- 89- Hamour, G.; Experientia, 2, 257, (1946)
- 90- Weetall, H.H. ; Nature, 223, 959 (1969)
- 91- Weetall, H.H. ; Science, 166, 615 (1969)
- 92- Imman, J.K. e Dintzis, H.M.; Biochemistry, 8, 4074 (1969)
- 93- Barker, S.A.; Somers, P.J.; Epton, R. e Mc. Laren, J.V.; Carbohydr. Res., 14, 287 (1970)
- 94- Patel, R.P.; Lopiekes, D.V.; Brown, S.R. e Price, S.; Biopolymers, 5, 577 (1967)
- 95- Erlanger, P.F.; Isambert, M.F. e Michelson, A.M.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 70, 40 (1970)
- 96- Patel, A.B.; Permington, S.N. e Brown, S.R.; Biochim. Biophys. Acta, 178, 20 (1969)

- 97- Hornby, W.E.; Phillipson, H. e Mc. Donald, A.; FEBS. Lett., 9,  
8 (1970)
- 98- Hornby, W.E. e Phillipson, H.; Biochim. Biophys. Acta, 220,  
343 (1970)
- 99- Imman, D.J. e Hornby, W.E. ;Biochem. J., 129, 255 (1972)
- 100- Wheler, K.P.; Edwards, B.A. e Whitan, R.; Biochim. Biophys.  
Acta, 191, 187 (1969)
- 101- Graven, G.R. e Gupta, V. ;Proc. Natl. Acad. Sci., 67 , 1329  
(1970)
- 102- Gabel, D.; Vretbald, P.; Axen, R. e Porath, J.; Biochim.  
Biophys. Acta, 214, 561 (1970)
- 103- Axen, R. e Porath, J.;Nature, 210, 367 (1966)
- 104- Green, M.L. e Grutchfield, G.; Biochem. J., 115, 183 (1969)
- 105- Gabel, D. e Hofsten, B. ; Eur. J. Biochem., 15, 410 (1970)
- 106- Goldstein, L. e Katchalski, E., Fermentation  
Advances, Academic Press, New York (1969)

- 107- Sehon, A. H.; Symp. Ser. Immunobiol. Scand., 4, 51 (1967)
- 108- Jansen, E.F. e Olson, A.C.; Arch. Biochem. Biophys., 129, 221  
(1969)
- 109- Goldman, R.; Silman, D.H.; Caplan, S.R.; Keden, O. e  
Katchalski, E.; Science, 150, 758 (1975)
- 110- Manecke, G.; Gurgel, G.; Naturwissenschaften, 54, 647 (1967)
- 111- Zahn, H.; Meinhofer, H.; Makromol. Chem., 26, 126-153 (1958)
- 112- Schick, H.F.; Singer, S.J.; J. Biol. Chem., 102, 2447 (1961)
- 113- Sumner, J.B.; J. Biol. Chem., 69, 435 (1926)
- 114- Marshal, E.K.; J. Biol. Chem., 15, 487 (1913)
- 115- Damodaram, M. e Sivaramakrishnan, P.M.; Biochem. J., 31,  
1041 (1937)
- 116- Machado, M.; Rev. Ass. Med. Bras., 4, 3 (1958)
- 117- Kistaiakowsky, G.B. e Shaw, W.H.R.; J. Am. Chem. Soc., 75,  
2751 (1953)
- 118- Gorin, G.; Biochemistry, I, 911 (1962)

- 119- Sidney, A.K. e Joseph, A.C.; Biochem. Biophys. Acta, 107,  
604 (1963)
- 120- Bahabur, K. e Chandra, V.; Proc. Natl. Acad. Scic., 132, 72  
(1962)
- 121- Leuthardt, F. e Kohler, F.; Helv. Chim. Acta., 7, 239 (1934)
- 122- Pitner, T.; Biochem. Z., 325, 239 (1953)
- 123- Fasman, G. e Nieman, G.; J. Am. Chem. Soc., 73, 1646 (1951)
- 124- Rateliff, N.M.; Anal. Chim. Acta, 239, 257 (1990)
- 125- Clark, L. e Lyon, C.; Ann. N. Y. Acad. Sci., 102, 29  
(1962)
- 126- Updike, S. e Hicks, G.; Nature, 214, 986 (1967)
- 127- Guilbault, G.G. e Montalvo, G.G.; J. Am. Chem. Soc., 91, 2164  
(1969)
- 128- Lenardo, R.A. e Rechnitz, G.A.; Anal. Chem., 46, 1109 (1974)
- 129- Tran Minh, C.; Selegny, E. e Brown, G.; C. R. Acad. Sci.  
Ser., 275, 309 (1972)

- 130- Guilbault, G.G. e Schu, F.; Anal. Chem., 44, 2101 (1972)
- 131- Gambino, S.R.; Clin. Chem., 7, 236, (1961)
- 132- Anfaldi, T.; Graneli, A. e Jagner, D.; Anal. Lett., 6, 969  
(1973)
- 133- Paspalathopoulos, D.S. e Rechntz, G.A.; Anal. Chim. Acta,  
79, 17 (1975)
- 134- Alexander, P.W. e Joseph, J.J.; Anal. Chim. Acta, 131, 103  
(1981)
- 135- Mosca, A.; Dosse, G.; Luzzana, M.; Bernardi, L.R.; Hopkins,  
H. P. e Carey, V.; Anal. Biochem, 112, 287 (1981)
- 136- Ripamonti, M.; Mosca, A.; Rovida, E.; Luzzana, M.; Luzi, L.;  
Ceriotti, F.; Cottini, F. e Bernardi, L.R.; Clin.  
Chem., 30, 556 (1984)
- 137- Kulys, J.J.; Gureviciene, V.V.; Laurinavicius, V.A. e  
Jonuska, A.V.; Biosensor, 2, 35 (1986)
- 138- Carr, P.W. e Bowers, D.; Immobilized Enzymes in Analytical  
and Clinical Chemistry, Wiley Interscience, New York, 1980

- 139- Ianniello, R.M. e Yacynych, A.M.; Anal. Chim. Acta, 131, 103 (1981)
- 140- Gris, W.T. e King, L.H.; Anal. Chem., 52, 270 (1980)
- 141- Laitiner, H.A. e Hseu, T.M.; Anal. Chem., 51, 1550 (1979)
- 142- Ardizzone, S.; Caruti, A. e Trasatti, S.; J. Electroanal. Chem., 126, 287 (1981)
- 143- Przybyt, M. e Sugier, H.; Anal. Chim. Acta, 239, 257 (1990)
- 144- Caras, S. e Janata, G.; Anal. Chem., 52, 1935 (1980)
- 145- Anzai, J.; Ohki, Y.; Tosa, T.; Nakajima, H. e Matsuo, T.; Chem. Pharm. Bull., 33, 2556 (1985)
- 146- Koryta, J.; Anal. Chim. Acta, 61, 329 (1972); 91, 1, (1977); 111, 1, (1979); 139, 1 (1982); 159, 1, (1984); 183, 1 (1986)
- 147- Morf, W.E., The Principles of Selective Electrode of Membrane Transport, Elsevier, Amsterdam, (1981)
- 148- Covington, A.K., Ion Selective Electrode Methodology, vol.1, G.R.C. Press, London (1979)

- 149- Vesely, J.; Weiss, D. e Stulick, K., Analysis with Ion Selective Eletrode, pp. 29; John Willey, New York (1978)
- 150- Siemroth, J. e Hennig, I., in Proceedings of the 3rd Symposium on Ion Selective Eletrodo; pp. 339, Elsevier, Amsterdan, (1981)
- 151- Pungor , E., in Proceedings of the Conference on Ion Selective Eletrodo, Elsevier, Amsterdan, (1979)
- 152- Jahnke, M.F.; Pal, F.; Toth, K. e Pungor, E., in Proceedings of the 4th Symposium on Ion Selective Eletrodo; pp. 373, Elsevier, Amsterdan, (1985)
- 153- Kanazawa, K.K.; Dias, A.F.; Geass, R.H.; Grel, W.D.; Kwok, J.F.; Logan, J.A.; Rabot, J.F. e Street, G.B.; J. Chem. Soc. Chem. Commun.; 854 (1974)
- 154- Ykarujama. Y. e Heineman. W.R., in Proceedings of the 2st International Meetings on Chemical Sensors, pp. 669, Bordeau (1986)
- 155- Yamamoto, T.; Sanechika, K. e Yamamoto, A.; J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed. 9, 18 (1980)
- 156- Nell, K.D. e Keenan, A.G.; Chem. Soc. Rev., 8, 259 (1980)

- 157- Faulkner, L.R.; Chem. Eng. News, 27, 28 (1984)
- 158- Cheek, G.; Wales, C.P. e Nowak, R.J.; Anal. Chem., 55, 380  
(1983)
- 159- Nylander, C.; Armgarth, M. e Lundstran, J., in Proceedings  
of the 1st International Meetings on Chemical  
Sensors, pp. 203, Amsterdam (1986)
- 160- Pandey, P.C. e Nishro, A.P.; Analyst, 113, 329 (1988)
- 161- Palleschi, G.; Mascini, M.; Martinez Fabregas, E. e Alegret,  
S.; Anal. Lett., 4, (7); 1115 (1988)
- 162- Guilbault, G.G. e Tarp, M.; Anal. Chim. Acta, 73, 355 (1974)
- 163- Uchiyama, S. e Rechnitz, G.A.; Anal. Lett., 20, (3) (1987)
- 164- Arnold, M.A. e Solsky, R.L.; Anal. Chem., 58, 84R (1986)
- 165- Rechnitz, G.A.; Arnold, M.A. e Meyertoff, M.E.; Nature, 278,  
466 (1979)
- 166- Concoran, C.A. e Rechnitz, G.A.; Trends in Biotechnology, 3,  
92 (1985)

- 167- Smit, N. e Rechnitz, G. A.; Biotechnol. Lett., 6, 209 (1984)
- 168- Karube, I.; Okada, T. e Suzuki, S.; Anal. Chem., 53, 1852  
(1981)
- 169- Hirose, S.; Hayashi, M.; Tamura, N.; Suzuki, S. e Karube, I.;  
J. Mol. Catal., 6, 251 (1979)
- 170- Karube, I.; Kuvo, I. e Suzuki, S.; An. N. Y. Acad. of Sci.,  
434 (1984)
- 171- Harrow, J. J. e Janata, J.; Anal. Chim. Acta, 174, 115 (1985)
- 172- Petersson, Bo. A.; Anal. Chim. Acta; 209, 239 (1988)
- 173- Ruzicka, R. J.; Talanta; 27, 147, (1980)
- 174- White, P. C.; Analyst; 109, 677 (1984)
- 175- Stulik, K. e Pacakova, U.; J. Electroanal. Chem.; 129, 1  
(1981)
- 176- Bard, A. J.; J. Chem. Educ.; 60, 302 (1983)
- 177- Murray, R. W.; Ewing, A. G. e Durst, R. A.; Anal. Chem. ; 59,  
3791 (1987)

- 178- Wang, J.; Anal. Chim. Acta; 234, 41 (1990)
- 179- Rechnitz, G.A.; Chem. Eng. News; 27, 29 (1975)
- 180- Joseph, J.P.; Mikrochim. Acta; 2 (5-6), 473 (1984)
- 181- Folch, J. e Stanley, G. S. ; J. Biol. Chem., 226, 409 (1957)
- 182- Cocking, E. C. e Yemm, E.W.; Bioch. J., 58 , 12 (1954)
- 183- Kobos, R.K., in Ion Selective Eletrodes in Analytical Chemistry, vol II, Chapter 1, Plenn Press, New York (1980)
- 184- Dean, R.B. e Dixon, W.J.; Anal. Chem.; 23, 263 (1951)