

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

UNICAMP

“Metodologias Analíticas Enzimáticas para Análise de Oxalato em Amostras de Interesse Biológico”

*Tese de doutorado apresentada
junto ao Instituto de Química
para obtenção do título de doutor
em Ciências, área de concentração
QUÍMICA ANALÍTICA.*

CANDIDATO : JOÃO ROBERTO FERNANDES

ORIENTADOR : Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto

CO-ORIENTADOR : Prof. Dr. Matthieu Tubino

**CAMPINAS
1996**



UNIDADE _____
 N.º CHAMADA: _____
 V. _____ E.A. _____
 TOMBADO BC/2 _____
 PROC. _____
 C D
 PREÇO _____
 DATA _____
 N.º CPD em 000-25320-1

Fernandes, João Roberto

"Metodologias analíticas enzimáticas para análise de oxalato em amostras de interesse biológico T/UNICAMP/F391m
 DEVOLVER NOME LEIT. (27108/96)

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
 UNICAMP

F391m Fernandes, João Roberto
 Metodologias analíticas enzimáticas para análise de oxalato em amostras de interesse biológico / João Roberto Fernandes. -- Campinas, [SP : s.n.], 1995.

Orientador: Graciliano de Oliveira Neto.
 Co-orientador: Mathieu Tubino.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

1. Oxalato oxidase. 2. Análise por injeção em fluxo (FIA).
 3. Biossensor. I. Oliveira Neto, Graciliano. II. Tubino, Mathieu.
 III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.
 IV. Título.



AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais pelo apoio nos momentos mais difíceis da vida.
- À minha esposa, ex-esposa e filhos pelos sacrifícios dispendidos durante esta empreitada.
- Aos colegas e amigos dos laboratórios do Bloco D do Instituto de Química, especialmente para o Carlos, Helena, Sayuri e Laércio, que sempre souberam conviver com transparência e instinto de companheirismo.
- Ao Instituto de Química da Unicamp pela excelente infra-estrutura de pesquisa que oferece a seus alunos.
- Aos professores : José Avelino, da Embrapa/Sete Lagoas-MG por ter fornecido as variedades de sorgo, Ciniro Costa e Disney A. Gonsales da Unesp-Botucatu pelas orientações técnicas e fornecimento de amostras.
- Ao professor Dr. Mathieu Tubino, pelas orientações sobre FIA.
- À Capes/PICD e Faculdade de Ciências-Unesp/Bauru, pelas bolsas e afastamentos concedidos, respectivamente.
- À Fapesp ,que contribuiu significativamente para a viabilidade do projeto.
- Em especial : Ao Prof. Dr. GRACILIANO DE OLIVEIRA NETO, não apenas pelas orientações puramente profissionais, mas também pela sua presteza e atenção em questões de ordem pessoal, ocasiões em que com sua experiência procurou nortear os caminhos, sempre imbuído de caráter humano.

PENSAMENTOS

“NÃO EXISTE ASSUNTO ESGOTADO, O QUE EXISTE É PESQUISADOR ESGOTADO DO ASSUNTO”

“A TEORIA GUIA, A PRÁTICA DECIDE” “KOLTHOFF”

“INVEJA, GANÂNCIA, PREPOTÊNCIA, VAIDADE, HIPOCRISIA E AVAREZ, MULTIPLICA TUDO POR MENOS UM QUE SUA VIDA E A DOS OUTROS SERÁ MUITO MELHOR”

“GUARDAR POR QUE? POR QUE GUARDAR?, SE A VIDA É TÃO CURTA E EXISTEM TANTAS COISAS A SEREM DESCOBERTAS E COMPARTILHADAS PELAS PESSOAS”

“TRAÇAR CAMINHOS É MUITO FÁCIL, O DIFÍCIL É DESCOBRIR E ADOPTAR AQUELES QUE NÃO OFUSQUEM OS SEMELHANTES”

“NASCER, CRESCER, PROCRIAR, VIVER INTENSAMENTE CADA MOMENTO COM AMOR, ESTE É O GRANDE MISTÉRIO DA VIDA”

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidas quatro metodologias enzimáticas para determinação de ácido oxálico. Em duas delas, empregou-se análise por injeção em fluxo(FIA) com reatores enzimáticos constituídos pelas enzimas oxalato oxidase, [E. C. 1.2.3.4] e peroxidase, [E. C. 1.11.1.7] imobilizadas sobre sorgo e cevada ativadas com glutaraldeído. Nas determinações por condutometria, o sistema apresentou comportamento linear na faixa de 0,05 a 0,50 mmol / L [$Y = 1,110 \text{ s.d. } 0,7681 + (229,4 \text{ s.d. } 3,013)X$], R 0,9997 (s.d. 1,2164) para N = 5, com repetibilidade de 3,2 %(r.s.d.) considerando uma solução 0,10 mmol / L e frequência de análise de 20 amostras / hora. Este procedimento foi aplicado com sucesso a amostras de urina pelo método da adição padrão apresentando boa correlação com o kit da Sigma[®]. De maneira semelhante, as características do sistema FIA espectrofotométrico foram: faixa linear, 0,05 a 1,0 mmol / L [$Y = 1,427 \text{ s.d. } 0,6075 + (94,81 \text{ s.d. } 1,580)X$]; R, 0,9995 s.d. 1,040 N=6 e repetibilidade, $\approx 4\%$. A técnica foi utilizada em determinações de ácido oxálico solúvel contido em capins, cujos resultados, mostraram-se concordantes com os do método comercial.

Nos outros procedimentos empregou-se eletrodos sensíveis a CO₂ e O₂.

Com o primeiro, a enzima foi usada no seu micro-ambiente natural, semente de sorgo (BR303), acondicionada em cloreto de potássio e colocadas num reator tipo “stirring bar”. As diferenças de potenciais apresentaram relação linear no intervalo 1,0 a 4,0 mmol / L. Pelo gráfico de Lineweaver-Burk, determinou-se a constante de Michaelis-Menten aparente, K_M 1,5 mmol / L. As enzimas oxalato oxidase de cevada e peroxidase de rábano foram imobilizadas sobre um eletrodo seletivo a oxigênio. Este biossensor bi-enzimático respondeu linearmente, no intervalo de 0,080 a 0,70 mmol / L [$Y = 0,08753 \text{ s.d. } 0,05358 + (7,701 \text{ s.d. } 0,1473)X$], $R=0,9993 \text{ s.d. } 0,08962$ para $N=6$ nas condições: pH 4,00 (tampão succinato) e temperatura de 27,0°C. Os interferentes mais significativos foram: ácido L-ascórbico, L-aminoácidos, Cu^{2+} e Al^{3+} . Porém, até 2 minutos de reação, praticamente não houve alteração, mesmo no caso de ativação promovida pelos íons Fe^{2+} . A metodologia mostrou-se promissora para determinações do analito em espinafre. Todos dispositivos enzimáticos mativeram em média 70% da atividade inicial ao fim de três meses de uso (20 análises por semana).

ABSTRACTS

Several enzymatic methodologies were developed for oxalic acid analyses. Conductimetric and spectrophotometric flow injection (FI) manifolds has been constructed with barley and sorghum oxalate oxidase, [E.C. 1.2.3.4] and horseradish peroxidase, [E.C. 1.11.1.7]. Conductimetry furnished linear range 0.05 to 0.50 mmol / L [$Y = 1.110 \text{ s.d. } 0.7681 + (229.4 \text{ s.d. } 3.013)X$], R, 0.9997 s.d. 1.216 for five analyses, repeatability 3.2% r.s.d. for 0.10 mmol / L oxalic acid solution and an analysis frequency of 20 samples per hour. It is successful procedure to analyses urine specimens showing good correlation with Sigma's kit[®]. In the same way, spectrophotometric method showed: linear range, 0.05 to 1.0 mmol / L [$Y = 1.427 \text{ s.d. } 0.6075 + (94.81 \text{ s.d. } 1.580)X$]; R, 0.9995 s.d. 1.040 and relative standard deviation less than 4%. The FI system was applied to determine soluble oxalic acid in grasses.

The CO₂ and O₂ gas sensing electrodes were employed to design “stirring bar reactor” and biosensor, respectively. Stirring bar reactor was filled with embebed aqueous KCl solution Sorghum vulgare, BR-303 variety seeds. Potentials variations furnished linear range 1.0 to 4.0 mmol / L. Apparent Michaelis-Menten constant, 1.5 mmol / L was obtained by Lineweaver-Burk

treatment. Bienzyme biosensor based in barley oxalate oxidase and horseradish peroxidase immobilized on O₂ transducer was constructed. A linear biosensor response was observed from 0,080 to 0.70 mmol / L [$Y = 0.08753 \text{ s.d. } 0.05358 + (7,701 \text{ s.d. } 0.1473)X$], $R=0.9993 \text{ s.d. } 0.08962$ for six measurements, at optimal conditions: pH 4,00 (succinate buffer with 1 mmol / L EDTA disodium salt) and 27,0⁰C. Until 2 minutes of the reaction time there is no influence from the interferences as, L-ascorbic acid, L-amino acids, Cu²⁺ and Al³⁺, as well from the activation by Fe²⁺ ions. This procedure was useful to determine soluble oxalic acid in spinach. After 3 months with 20 analyses per week, all enzymatic materials remained 70% of the initial activities.

ÍNDICE GERAL

I- INTRODUÇÃO	1
I.1 OCORRÊNCIA E TOXICIDADE DOS OXALATOS	1
I.2 - MÉTODOS PARA ANÁLISES DE OXALATOS	5
I.2.1 TESTES QUALITATIVOS.....	6
I.2.2 - MICROSCÓPICO.....	10
I.2.3 - CROMATOGRÁFICOS	11
I.2.4 - POLAROGRÁFICO.....	17
I.2.5 COLORIMÉTRICOS	17
I.2.6 ENZIMÁTICOS	20
I.2.6.1 BIOSSENSORES PARA OXALATO.....	24
I.2.6.2 ENZIMÁTICOS POR FIA.....	29
I.3 OBJETIVOS DA TESE.....	31
II. PARTE EXPERIMENTAL.....	32
II.1 SOLUÇÕES E PADRÕES.....	32
II.2 MATERIAIS E APARELHAGEM.....	34
II.3 IMOBILIZAÇÕES ENZIMÁTICAS	44
II.3.1 MATRIZES INORGÂNICAS	44

II.3.2	ÁLCOOL POLIVINÍLICO	47
II.3.3	QUITINA.....	48
II.3.4	MATRIZ NATURAL.....	48
II.3.5	MATRIZES NATURAIS ATIVADAS.....	49
II.4	MEDIDAS COM ELETRODO SENSÍVEL A CO ₂	50
II.5	ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA).....	51
II.5.1	PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS	53
II.5.2	PROCEDIMENTO ANALÍTICO CONDUTOMÉTRICO	55
II.5.3	PROCEDIMENTO ANALÍTICO ESPECTROFOTOMÉTRICO .	57
II.5.4	METODOLOGIA COMPARATIVA	59
II. 6	BIOSSENSOR BI-ENZIMÁTICO	59
II.6.1	PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.....	60
II.6.2	MONTAGEM E METODOLOGIA	60
III -	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
III.1	IMOBILIZAÇÕES.....	62
III.2	ELETRODO SENSÍVEL AO DIÓXIDO DE CARBONO	66
III.3	MÉTODOS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA).....	76
III.3.1	CONDUTOMETRIA.....	77
III.3.2	ESPECTROFOTOMETRIA	87

III.4 BIOSSENSOR BI-ENZIMÁTICO	97
IV. CONCLUSÕES.....	109
V. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	111
VI. BIBLIOGRAFIA	113

ÍNDICE DE TABELAS

I.1 - INTERVALOS DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO OXÁLICO EM URINAS NORMAIS	3
I.2 - VALORES DE R_F PARA TRÊS ÁCIDOS ORGÂNICOS	9
II.1 - MASSAS AMOSTRADAS, SECAS E ANALISADAS PARA VARIEDADES DE CAPINS	54
III.1 - CORRELAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS FIA CONDUTOMÉTRICO E DA SIGMA	86
III.2 - PARÂMETROS OPERACIONAIS DO SISTEMA FIA ESPECTROFOTOMÉTRICO	89
III.3 - VALORES OBTIDOS NOS MÉTODOS FIA E SIGMA PARA CAPINS	96
III.4 - INTERFERÊNCIAS DE ÍONS METÁLICOS SOBRE O BIOSENSOR	107

ÍNDICE DE FIGURAS

II.1 - ELETRODO COMERCIAL SENSÍVEL A CO ₂	35
II.2 - ESQUEMA DE CÉLULA PARA MEDIDAS COM ELETRODO SENSÍVEL A CO ₂	38
II.3 - CÉLULA CONDUTOMÉTRICA PARA MEDIDAS EM FLUXO	39
II.4 - DISPOSITIVO DE PROTEÇÃO EM RELAÇÃO A CO ₂ DO AR	41
II.5 - MONTAGEM USADA NAS MEDIDAS FEITAS COM O BIOSSENSOR	42
II.6 - ESQUEMA DO ELETRODO COMERCIAL SENSÍVEL A O ₂	43
II.7 - SISTEMAS DE FLUXO UTILIZADOS NAS MEDIDAS COM ELETRODO SENSÍVEL A CO ₂	52
II.8 - SISTEMA FIA PARA MEDIDAS CONDUTOMÉTRICAS	56
II.9 - SISTEMA FIA PARA MEDIDAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS	58
III.1 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A RESPOSTA DA ENZIMA DO SORGO	69
III.2 - INFLUÊNCIA DO pH SOBRE A RESPOSTA DO REATOR “STIRRING BAR”	70
III.3 - CURVA ANALÍTICA PARA O REATOR “STIRRING BAR”	72

III.4 - GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK	73
III.5 - EFEITO DE Cu(II) SOBRE A ENZIMA DE SORGO	75
III.6 - INFLUÊNCIA DO pH NAS MEDIDAS EM FIA CONDUTOMÉTRICO	78
III.7 - CONDIÇÕES DE FUNCIONAMENTO DO FIA CONDUTOMÉTRICO	80
III.8 - VARREDURAS DE SOLUÇÕES PADRÕES NO FIA CONDUTOMÉTRICO	81
III.9 - CURVA ANALÍTICA DO FIA CONDUTOMÉTRICO	82
III.10 - GRÁFICO DA ADIÇÃO PADRÃO PARA URINA <u>N</u>	84
III.11 - GRÁFICO DA ADIÇÃO PADRÃO PARA URINA <u>E</u>	85
III.12 - RESPOSTA DO FIA ESPECTROFOTOMÉTRICO EM FUNÇÃO DA [PBC]	90
III.13 - EFEITO DO PH SOBRE A RESPOSTA DO FIA ESPECTROFOTOMÉTRICO	91
III.14 - VARREDURAS PARA O SISTEMA FIA ESPECTROFOTOMÉTRICO	92
III.15 - CURVA ANALÍTICA PARA O SISTEMA FIA ESPECTROFOTOMÉTRICO	93

III.16 - VARREDURAS DO SISTEMA FIA PARA CAPINS	95
III.17 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A RESPOSTA DO BIOSENSOR	100
III.18 - EFEITO DO PH SOBRE A RESPOSTA DO BIOSENSOR	101
III.19 - DISPOSIÇÃO DAS ENZIMAS NO BIOSENSOR	103
III.20 - CURVA ANALÍTICA PARA O BIOSENSOR	104
III.21 - COMPORTAMENTO CINÉTICO DO BIOSENSOR EM MEIO COM INTERFERENTES	105

I- INTRODUÇÃO

I.1 OCORRÊNCIA E TOXICIDADE DE OXALATOS

A família oxalidaceae compreende oito gêneros com ocorrência predominante nas zonas tropicais e sub-tropicais do hemisfério sul. Geralmente são herbáceas, com folhas compostas, trifoliadas (Oxalis) ou com maior número de folículos (Averrhoa). Têm frutos baciformes, angulosos com secção estrelada⁽¹⁾. Estas são as principais características desta família de plantas ricas em ácido oxálico. Como exemplos, incluem-se as várias espécies de trevo ou azedinha, que são pragas dos jardins, o gênero Averrhoa, popularmente conhecida como carambola, originária da Malásia, e o Biophytum, cultivado em viveiros ou presente em cerrado. Algumas espécies sub-arbustivas do gênero Oxalis, normalmente aparecem na natureza.

Em tecidos vegetais como tomate, espinafre, laranja, cacau, chás, capins, são encontradas quantidades significativas de oxalatos de cálcio, sódio e potássio e do próprio ácido oxálico. Em produtos industrializados, como suco de laranja, chocolate, cerveja⁽²⁾ e rolhas para vedar bebidas⁽³⁾, o ácido oxálico, além de estar presente, relaciona-se diretamente com a qualidade destes manufaturados. Também aparecem em formulações de alvejantes, no tratamento de couro e em removedores de tintas e ferrugem⁽⁴⁾.

Pela análise mamográfica de cristais formados em tecidos do seio humano, pode-se diferenciar tumores cancerígenos⁽⁵⁾. Através da morfologia, tamanho e distribuição, os depósitos são caracterizados em oxalatos e fosfatos de cálcio, os quais relacionam-se diretamente com tumores benignos e malignos, respectivamente. Outro tipo de tumor, o granuloma, também é caracterizado pelo aparecimento de cristais de oxalato nos testículos⁽⁶⁾ em pacientes com mais de 30 anos e com comprovada deficiência renal crônica. Já em amostras de saliva, dentes e tártaro dentário, o ácido oxálico na ordem de mmol / L, é indicativo de um mecanismo fisiológico de defesa para os dentes⁽⁷⁾.

O ácido oxálico puro é altamente corrosivo e irritante em contato com a pele, olhos e mucosa, sendo letal se ingerido diretamente. Porém, com os devidos cuidados de manipulação, rotulação e armazenamento, a possibilidade de intoxicação fica praticamente descartada. Por outro lado, indivíduos com comprovada tendência em produzir cristais na urina, podem acelerar este fenômeno pela ingestão de alimentos que contenham quantidades significativas desse ácido. A esta anomalia dá-se o nome de cristalúria, que em urinas ácidas, formam predominantemente, depósitos de oxalatos de cálcio e magnésio, além do próprio ácido oxálico. Níveis elevados (Tabela I.1) de ácido oxálico, em

urinas excretadas durante 24 horas, também podem indicar diagnóstico clínico de vários tipos de hiperoxaluria, uma deficiência genética da via metabólica.

Tabela I.1 - Intervalos de concentração de ácido oxálico excretado em urinas de 24 horas por três classes de indivíduos normais.

classe de indivíduo	mmol / 24 horas	mg / 24 horas
masculino adulto	0,08 a 0,49	7 a 44
feminino adulto	0,04 a 0,32	4 a 31
criança	0,14 a 0,42	13 a 38

A presença do ácido oxálico em plasma e soro sanguíneo, também conduz ao diagnóstico das anomalias já citadas.

Praticamente todas espécies de capins para pastagem contêm em seus tecidos ácido oxálico e oxalatos de potássio, de sódio e de cálcio⁽⁸⁾ com predominância das formas solúveis. Foram detectados vários casos de intoxicação em bovinos⁽⁹⁻¹¹⁾ e equinos^(12,13) provocados por este ácido. Capins, como Setaria, apresentam os maiores teores (oxalato total), quando comparados com outras gramíneas forrageiras, ou seja, cerca de 4% da matéria seca no

cultivar Kazungula e por volta de 3% nos cultivares Naraok e Nandi⁽¹⁴⁾ e nas braquiárias estes teores não atingem 1%⁽¹⁵⁾.

As concentrações de oxalato nos tecidos de capins variam em função de vários fatores. Normalmente, são maiores nas folhas e nas plantas mais jovens^(8,16), em solos com alta disponibilidade natural de nitrogênio ou potássio ou por adubação^(8,17). Teores em ácido oxálico superiores a 4%, em alimentos, podem ser considerados tóxicos⁽¹⁸⁾, quando ingeridos por animais famintos, em mal estado nutricional ou recém-paridos. Animais em estado de lactação têm grande exigência dos íons cálcio que por complexação tornam-se indisponíveis na presença de oxalatos. Assim, neste estágio, a susceptibilidade à tetania hipocalcêmica, tetania hipomagnésiana, além da desmineralização óssea, parece ser bem mais acentuada nestes espécimes, podendo levá-los até à morte.

Considerando as peculiaridades das áreas médica e veterinária, associadas às implicações destas com o ácido oxálico, faz-se necessário o desenvolvimento de procedimentos simples, de baixo custo e com alta seletividade, para as determinações deste analito em amostras complexas como urina, plasma sanguíneo, alimentos e capins. Dentre as metodologias disponíveis, aquelas baseadas em enzimas imobilizadas são mais atraentes, principalmente quando associadas, ou a sistemas FIA, ou a sondas comerciais,

que apresentem uma membrana de separação entre o meio de medida e o sensor propriamente dito. Certamente com estas considerações de ordem geral, pode-se conseguir arranjos experimentais que forneçam procedimentos analíticos não tediosos, e com boa performance.

I.2 - MÉTODOS PARA ANÁLISES DE OXALATOS

Em meados de 1800, Donne^(19,20) e Bird⁽²¹⁾, já mostravam grande interesse nas determinações de ácido oxálico em depósitos encontrados em urinas. Reoch⁽²²⁾ conseguiu fazer uma contagem de cristais de oxalato de cálcio em urinas tratadas com etanol, sendo este o primeiro método semi-quantitativo descrito até então. Lehman⁽²³⁾, em 1851, foi o pioneiro no desenvolvimento de um procedimento analítico quantitativo para oxalato. Para isto, fazia a secagem da urina por evaporação, extraía o resíduo com etanol, lavava o extrato com éter dietílico, calcinava e pesava ao final como carbonato de cálcio.

Depois da metade do século XIX, apareceu o método mais aceito para dosagens de ácido oxálico, introduzido por Neubauer e Vogel⁽²⁴⁾, o qual envolve em linhas gerais: re-precipitação, calcinação e pesagem como óxido de cálcio. Muitas modificações referentes a este método surgiram, porém, as contribuições mais significativas da época, estão relacionadas com extrações líquido-líquido manual⁽²⁵⁾ e em sistema contínuo⁽²⁶⁾.

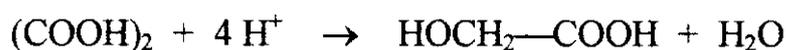
A introdução da titulação com permanganato tornou-se um grande avanço quando comparada às demoradas etapas envolvidas na gravimetria. Inicialmente, desenvolvida para analisar íons ferrosos por Margheritte⁽²⁷⁾, esta técnica volumétrica foi a primeira a envolver uma reação para análise com abordagem cinética⁽²⁸⁾.

I.2.1 TESTES QUALITATIVOS - *preliminares* : O ácido oxálico pode de uma maneira preliminar ser identificado através de testes de solubilidade, por aquecimento e reações com o ácido sulfúrico concentrado e permanganato. Oxalatos de metais alcalinos e de íons ferrosos são solúveis em água enquanto que os outros, são insolúveis ou pouco solúveis neste solvente. Numa mistura de ânions, os oxalatos podem ser reconhecidos pela adição de íons Ca^{2+} ou Ag^+ que formam compostos insolúveis, com $K_{\text{PS}} = 2,3 \cdot 10^{-9} \text{ mol}^2 \text{ L}^{-2}$ e $1,1 \cdot 10^{-11} \text{ mol}^3 \text{ L}^{-3}$, respectivamente, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Por aquecimento ou adição de ácido sulfúrico concentrado, ocorre a decomposição do analito, com a liberação de dióxido de carbono e monóxido de carbono.



A possibilidade de identificação destes gases é feita pela passagem por uma solução de “água de barita” ou pela ignição na boca de um tubo de ensaio,

que eventualmente possam causar interferência. b) fluoresceína - Vários ácidos carboxílicos podem reagir com resorcinol, ácido sulfúrico concentrado ou hidróxido de sódio, para produzir o fenômeno de fluorescência. Dorronsoro e Fernandez⁽²⁹⁾, observaram uma cor verde pela reação do ácido oxálico com resorcinol, e esta mesma reação foi adaptada por Chernoff⁽³⁰⁾ num teste conhecido por formação de anel azul. c) conversão a ácido glicólico - O ácido oxálico é reduzido a ácido glicólico pelo hidrogênio nascente gerado por zinco ou magnésio em solução de ácido diluído.



O ácido glicólico pode então ser identificado pela reação com ácido sulfúrico e ácido cromotrópico dando um composto violeta ou violeta avermelhado. O aparecimento destas cores caracterizam a presença do analito. d) cromatografia em papel - A utilização desta técnica para identificação de ácido oxálico em vários fluidos biológicos, está sempre associada com problemas práticos. Dificilmente se conseguia valores razoáveis de R_f pelo uso da modalidade unidimensional. Apesar disso, Allen⁽³¹⁾ identificou com sucesso, o ácido oxálico em culturas de Chlamydomonas sp., usando cromatografia unidimensional descendente. Para isto; as etapas de filtração, concentração a

vácuo e desmineralização; foram necessárias para que as amostras fossem cromatografadas em três misturas de solventes como segue na Tabela II.2.

Tabela I.2 - Valores de R_f para três ácidos orgânicos obtidos em três fases móveis.

FASE MÓVEL	GLICÓLICO	CÍTRICO	OXÁLICO
F1	0,67	0,40	0,40
F2	0,70	0,65	0,75
F3	0,57	0,35	0,61

F1 = fase composta por fenol e água; F2 = n-butanol e ácido acético e e F3 = n-propanol, eucaliptol e ácido fórmico.

Em amostras como urina, Stern⁽³²⁾ eliminou interferências pelo uso de uma coluna de troca iônica para garantir melhor resolução. Considerando que os testes qualitativos, geralmente, são empregados em situações nas quais exige-se rapidez, esta técnica parece não ser adequada. e) testes com agentes localizadores - Uma mistura composta de ferrocianeto de potássio 10 % m/v e sulfato de amônio e ferro(III) 0,5% m/v em etanol 70% v/v, produz um composto azul brilhante quando reage com o ácido oxálico⁽³³⁾. Também é

possível a análise qualitativa deste ácido pela supressão de fluorescência do complexo formado pela reação entre sulfato de alumínio com 8-hidroxiquinolina⁽³⁴⁾. Sob a luz ultravioleta, o analito aparece como uma mancha azul escura sobre uma fluorescência de fundo amarela. Esta reação apesar de mostrar boa sensibilidade (0,5 a 2,0 µg) não apresenta especificidade aceitável.

I.2.2 - MICROSCÓPICO

A identificação de depósitos de oxalato em materiais biológicos, por microscopia, baseia-se na morfologia dos cristais formados. Em plantas, geralmente, as formações são intracelulares, solitárias e de vários tipos, ou aparecem como aglomerados (rápides e drusas). Já nos tecidos animais, cristais de oxalato de cálcio, usualmente são extracelulares e na forma de roldanas ou rosetas. Outras informações podem ser obtidas pelo uso de luz polarizada, analisando-se a bi-refringência, cujo efeito é o aparecimento de brilho colorido. Esta técnica, além de ser pouco difundida entre os químicos, requer o uso de ferramentas específicas e a necessidade de um operador especialista. Apesar disso, profissionais da área clínica têm utilizado a técnica para diagnóstico de pedras nos rins pela análise de urinas. Isto é feito pela caracterização e contagem dos cristais num campo óptico fornecido por um hemacitômetro. Este

procedimento, além de susceptível a erros de ordem operacional, são sensíveis apenas para amostras com altas concentrações de ácido oxálico em relação aos intervalos de controle normal.

I.2.3 - CROMATOGRÁFICOS

Na literatura estão descritos diversos métodos para análise de oxalato, que empregam as várias modalidades desta técnica. Em 1974, Roughan e Slack⁽³⁵⁾ propuseram uma metodologia semi-quantitativa baseada na cromatografia de camada delgada, na qual utilizaram sílica gel e benzeno como fases estacionária e móvel, respectivamente. Fizeram parte do procedimento, etapas de extração a partir de capim seco e pulverizado, derivatização (metilação) e revelação com cloridrato de hidroxilamina e cloreto férrico. O metil oxalato foi visualizado como manchas marrons quando submetido a vapores de amônia. A metodologia proposta mostrou-se eficaz na detecção de 1% em ácido oxálico. Com esta mesma finalidade, considerando-se necessidades semi-quantitativas, também mostraram-se eficientes as modalidades de cromatografia de partição, troca iônica e filtração em gel.

Aproveitando a mesma reação de metilação usada por Roughan e Slack⁽³⁵⁾, a empresa BLM consultoria, Assistência Técnica e Planejamento Agro-pecuário S/C Ltda., São Paulo, desenvolveu uma metodologia baseada na

técnica de cromatografia gasosa, voltada para análises em forrageiras, fenos, silagens e rações. Em linhas gerais, para execução deste procedimento, é necessário o manuseio com uma mistura de clorofórmio anidro e metanol absoluto a 2+1 (v+v) e ácido sulfúrico concentrado. Além disso, são requeridos, período de incubação 90 minutos à temperatura de 4°C, coluna de 2 m x 3 mm contendo 17% de etileno glicol succinato em Cromosorb® W-DCMS a 100°C, injetor/detector a 200°C e nitrogênio gasoso, com fluxo de 25 mL min⁻¹. Para obtenção da % de ácido oxálico, usa-se a fórmula que segue.

$$\% \text{H}_2\text{Ox} = A_a \cdot M_p \cdot 100 \div A_p \cdot M_a$$

onde: A_a , A_p , M_a e M_p = áreas dos picos e massas referentes à amostra e ao padrão, respectivamente. O emprego desta técnica exige o manuseio de substâncias altamente tóxicas, bem como a utilização de equipamento com custos de manutenção relativamente altos. Além disso, devem ser consideradas as reações de derivatização muito comuns nestes procedimentos.

Outra metodologia fundamentada na cromatografia gasosa foi aprimorada por France e Wallace⁽³⁶⁾, que fizeram a correlação com espectrometria de massa com diluição isotópica. Neste caso, o procedimento analítico foi direcionado para a análise de oxalato em plasma sanguíneo. Inicialmente, foram necessárias várias etapas dispendiosas e a utilização do

reagente n-metil-n-(terc-butildimetilsilil)trifluoracetamida que forma um derivado pouco estável. Portanto, trata-se de uma metodologia adequada para análise de oxalato em plasma em situações onde a demanda de amostras não seja elevada.

Além de amostras de plasma sanguíneo⁽³⁷⁾, também foram objeto de estudo pela técnica de cromatografia iônica, líquido amniótico⁽³⁸⁾, o mineral baierita⁽³⁹⁾ e vegetais⁽⁴⁰⁾. Em todas, etapas de ultrafiltração e acidificação das amostras são necessárias para eliminação de interferências, principalmente de ácido L-ascórbico em amostras sanguíneas⁽⁴¹⁾. A resolução dos cromatogramas, normalmente pobres, apresentaram um tempo de retenção da ordem de minutos e também requereram as mesmas técnicas de suporte empregadas nas outras metodologias. Dentre os métodos citados por cromatografia iônica, um deles combina no arranjo experimental, uma pós-coluna de detecção, baseada na quimiluminescência do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$, com adaptação para análise por injeção em fluxo⁽³⁹⁾. Neste procedimento, obteve-se boa sensibilidade (10^{-7} mol / L), comum a este tipo de detecção. Em contra partida, não foi aplicado em amostras sanguíneas e urina que apresentam as maiores interferências. Além disso, foi exigido um esquema FIA relativamente complicado.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem-se destacado dentre as modalidades cromatográficas para diferentes determinações na área médica e biológica. Particularmente, para as análises de ácido oxálico em amostras de urina e plasma, esta técnica tem se mostrado adequada quando observadas a separação dos picos e limites de detecção^(42,43). Em ambos, não são dispensáveis também, reações de derivatização, desproteínização e filtração, comuns a outras metodologias. Da recepção das amostras até injeção no cromatógrafo são necessárias aproximadamente seis horas para o tratamento. Adicionalmente, estudos sobre reprodutibilidade, mostraram variabilidade considerável dos resultados obtidos por HPLC⁽⁴⁴⁾. Assim, pelo arranjo de procedimentos experimentais que envolvam, por exemplo, a técnica e enzimas imobilizadas, pode-se reduzir a níveis aceitáveis as variações observadas nas calibrações inter-laboratórios.

Menon e Mahle⁽⁴⁵⁾, utilizaram a cromatografia iônica com detecção condutométrica, fazendo a atribuição do pico correspondente ao oxalato pelo tratamento das amostras com a enzima oxalato descarboxilase antes da injeção no cromatógrafo. Observaram então o desaparecimento do sinal analítico e consequente aparecimento de um sinal típico do íon formiato, produto de reação de ácido oxálico catalisada pela enzima. Apesar da simplicidade no

tratamento da amostra, esta metodologia apresentou um tempo de eluição de 20 minutos para o registro do oxalato, portanto, inadequado para análises de urina. Martz et alii⁽⁴⁶⁾, propuseram um procedimento aplicado a amostras de forragens empregando HPLC. Em primeira instância, fizeram: extração dos oxalatos (solúveis e insolúveis), incubação por dezesseis horas com oxalato descarboxilase e derivatização a 110⁰C por seis horas. Assim, por motivos semelhantes aos anteriormente citados, a metodologia não se mostrou atrativa. Nos procedimentos descritos^(45,46), utilizaram enzimas solubilizadas com o intuito de produzir derivados que pudessem auxiliar no reconhecimento e detecção do analito, não havendo reaproveitamento do material bioativo. Um avanço em relação a estes métodos, foi alcançado por Yamato et alii⁽⁴⁷⁾ que imobilizaram a enzima oxalato oxidase sobre um gel AF-tresiltoyopear 650TM, construíram um reator, e este foi inserido num sistema de fluxo. A separação do analito foi feita por HPLC e a detecção, amperométrica do peróxido de hidrogênio, feita sobre um eletrodo de platina a +0,50 V versus Ag/AgCl. Obviamente que neste potencial, as interferências presentes nas amostras trariam problemas caso o método de separação prévio não fosse adotado.

A determinação de ácido oxálico em sangue e urina também foi executada por cromatografia líquida com detecção eletroquímica⁽⁴⁸⁾. Como

eletrodo de trabalho, utilizaram pasta de carbono contendo cobalto ftalocianina, onde aplicaram +0,75 V versus Ag/AgCl. Apesar do procedimento não incluir tratamento elaborado das amostras e apresentar baixo tempo de eluição para ácido oxálico (cerca de 3 minutos), exibiu problemas de envenamento e reprodutibilidade da superfície do eletrodo de trabalho. Outro procedimento mais engenhoso e relativamente bem sucedido foi apresentado por Skotty e Nieman⁽⁴⁹⁾, que combinaram HPLC com detecção de quimiluminescência gerada eletroquimicamente. O oxalato é separado numa coluna de fase reversa e o eluato é combinado com um fluxo de $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$. Na célula de fluxo, o complexo é oxidado sobre um eletrodo de platina, reagindo com o oxalato para produzir o fenômeno da luminescência. A metodologia apresentou bom limite de determinação ($1\mu\text{mol} / \text{L}$), tempo de retenção de 5,3 minutos para separação do ácido oxálico e arranjo de fluxo muito complicado. Mesmo tratando-se de uma combinação aplicável às análises de oxalato, a metodologia apresentada exigiu a utilização de três equipamentos de médio porte: fotômetro, cromatógrafo HPLC e potenciostato, o que leva a arranjos de FIA não funcionais e, restrição de uso de equipamentos.

I.2.4 - POLAROGRÁFICO

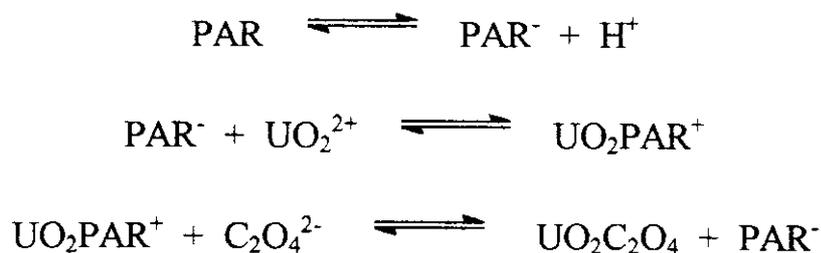
Através de uma reação de derivatização entre ácido oxálico e o-fenilenodiamina, obtém-se um produto eletroativo, 2,3-dihidroxiquinoxalina, que apresenta um pico máximo por volta de +0,900 V versus Ag/AgCl (KCl 3 mol / L). Empregando esta reação, foram desenvolvidas por Rodrigues e Barros⁽⁵⁰⁾, metodologias baseadas na técnica polarográfica de pulso diferencial, para analisar ácido oxálico em rolhas, cerveja e espinafre. Observou-se boa sensibilidade, 5×10^{-8} mol / L e intervalo linear 2×10^{-7} a 2×10^{-5} mol / L. Por outro lado, envolve preparação elaborada e é pouco seletiva, sofrendo influências de interferentes como dos ácidos L-ascórbico, maleico, glioxílico e fumárico, além do que, no potencial de estudo, interferências oriundas de matéria orgânica, são bastante comuns nestas amostras.

I.2.5 COLORIMÉTRICOS

Um grande número de metodologias baseadas em soluções coloridas foram desenvolvidas para determinações de ácido oxálico em amostras biológicas. São exemplos: a formação do complexo vermelho de ácido pervanádico com metavanadato e peróxido de hidrogênio (Mitchell)⁽⁵¹⁾, a reação entre o analito e complexo verde formado entre ferro (III) e ferron que provoca descoloramento (Burrows)⁽⁵²⁾ e a formação de um complexo vermelho

com indol (Hausman)⁽⁵³⁾. Para fins quantitativos, todos exibiram baixas sensibilidade e seletividade. Outras possibilidades foram testadas utilizando-se fenilhidrazina⁽⁵⁴⁾ e 2,7-dihydroxinaftaleno-ácido cromotrópico⁽⁵⁵⁾, que apresentaram como principais limitações, a necessidade de precipitação do ácido oxálico e uso de ácido sulfúrico 18 mol / L para desenvolvimento de cor, respectivamente. Dutt e Motola⁽⁵⁶⁾, propuseram um método baseado na oxidação de ferroína por Cr(VI) para análise de oxalato em amostras de urina e sangue. Mesmo exibindo um intervalo útil de determinação compreendido entre 0,7 e 3,5 µg / mL e um limite de detecção de 0,5 µg / mL, a metodologia sugerida conta com elaborados passos de desproteinização e extração para ambas as amostras. Também com base na técnica de extração, Salinas⁽⁵⁷⁾, nos mesmos tipos de amostras conseguiu determinar o ácido oxálico, reagindo-o com vanádio(V) e ácido mandelohidroxâmico(MHA) formando o complexo $[V^v (MHA)(C_2O_4)_2]^{3-}$, que absorve em 535 nm. Os resultados foram um limite de detecção de 0,5 µg / mL, intervalo linear de 1,5 a 8,8 µg / mL e trinta minutos para o desenvolvimento de cor. Visando diagnóstico clínico através de análises de urinas, Baadenhuijen e Jansen⁽⁵⁸⁾, utilizaram a reação de urânio (IV) com 4-(piridilazo)resorcinol (PAR) para formar um complexo vermelho. Em meio

ácido, ocorreu diminuição significativa de absorvância da espécie a 515 nm pela presença de oxalato.



Obteve-se os parâmetros semelhantes aos métodos anteriores e também foi necessário a precipitação com íons cálcio.

Salvo as considerações de ordem técnica e de definição envolvidas nas medidas por colorimetria e luminescência, algumas metodologias baseadas em quimiluminescência foram propostas para análise do ácido oxálico com o objetivo de melhorar a sensibilidade e a seletividade. Em 1991, Albrecht⁽⁵⁹⁾ et alii, aplicaram uma metodologia baseada na luminescência de peroxioxalato para determinação de oxalato e porfirinas em amostras de urina. A grande vantagem apresentada foi a ausência da precipitação do oxalato e os excelentes níveis de detecção (10 nmol / L). Em 1993, os mesmos autores utilizaram a mesma metodologia aplicada a amostra de plasma sanguíneo, mas com uma abordagem médico clínica⁽⁶⁰⁾. Também com base no fenômeno da luminescência, num arranjo elegante utilizando fibra óptica, determinou-se ácido oxálico em vegetais⁽⁶¹⁾. A espécie ativa foi gerada eletroquimicamente

sobre um eletrodo de platina modificado com o $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ / Nafion[®], e colocado contra a face de uma fibra optica. Tal arranjo permitiu determinações da ordem de 1×10^{-4} a 1×10^{-3} mol / L em amostras de espinafre e mostrou boa correlação quando comparado com cromatografia iônica.

As metodologias colorimétricas para determinação de ácido oxálico apresentadas, geralmente, envolvem várias etapas de preparação das amostras. Por isso, procedimentos fundamentados na eletrogeração de compostos luminescentes por via enzimática ou não, associados a dispositivos como a fibra optica, podem fornecer várias possibilidades que visam a automatização e monitorização *in loco* de processos industriais e eventos metabólicos humanos *in vivo*.

1.2.6 ENZIMÁTICOS

As enzimas são proteínas globulares, que funcionam como catalisadores biológicos, cujas estruturas tridimensionais fornecem arcabouços moleculares altamente específicos para reconhecimento químico de substratos. Estas macromoléculas bioativas conseguem a conversão de reagentes a produtos com praticamente 100% de rendimento em temperaturas próximas a do ambiente. São sintetizadas no meio vivo, vegetal, animal e protista, estando associadas a outras espécies como lipídios, polissacarídeos e outras proteínas de

constituição. Assim, para fins analíticos, normalmente devem ser parcial ou totalmente purificadas.

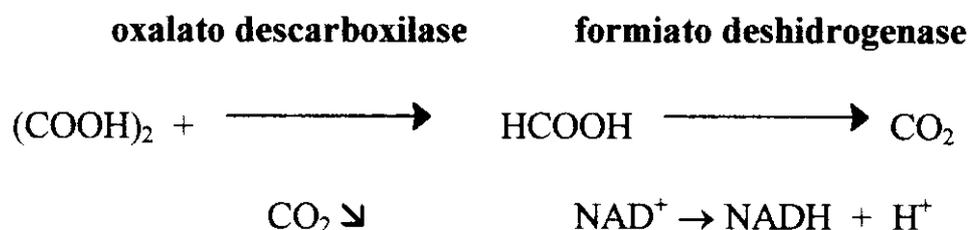
No caso particular do substrato oxalato, a enzima oxalato descarboxilase ([E.C. 4.1.1.1]), isolada pela primeira vez de um fungo de madeira, Colybia velutipes⁽⁶²⁾, catalisa a reação :



e mostrou atividade em pH 3,0. Crawhall e Watts⁽⁶³⁾, empregaram esta enzima para análise do analito em plasma sanguíneo, medindo o dióxido de carbono com um manômetro especial. No entanto, para as amostras com níveis normais, não conseguiram sensibilidade suficiente. Pela utilização do mesmo princípio Mayer et alii⁽⁶⁴⁾, aplicaram pela primeira vez o biocatalisador visando análises de urinas. Outras sequências experimentais alternativas foram introduzidas⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾, e todas apresentaram como novidades : aumento da quantidade de enzima; desproteinização, filtração e remoção do CO₂ das amostras e interferências de fosfato e sulfato.

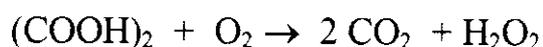
A enzima oxalato descarboxilase foi acoplada a outras enzimas, por exemplo, formiltetrahidrofolato sintetase, [E.C. 6.3.4.3]⁽⁶⁸⁾ e formato desidrogenase, [E.C. 1.2.1.2]⁽⁶⁹⁾ para determinações de ácido oxálico. No primeiro caso, o íon formiato obtido pela conversão de ácido oxálico, reage

numa segunda etapa com tetrahydrofolato, para formar N¹⁰-formiltetrahydrofolato. Em meio ácido, este composto, transforma-se numa espécie que absorve intensamente em 350 nm. Assim, as variações de absorbância foram relacionadas diretamente com as concentrações do analito. No segundo, ocorreram as reações que seguem, medindo-se espectrofotometricamente a redução do NAD⁺.



Apesar de aplicáveis a várias amostras, estas metodologias requereram grandes quantidades de enzimas purificadas.

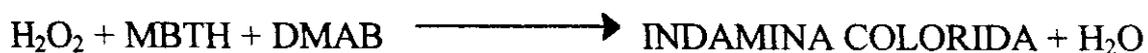
Em 1930, observaram que extratos brutos de tecidos vegetais de cevada apresentavam atividade frente ao oxalato. A partir deste fato, trinta e três anos mais tarde, foi isolada de musgos e sementes de cevada⁽⁷⁰⁾ uma enzima com esta propriedade, a qual chamaram de oxálico oxidase. Esta, denominada contemporaneamente de oxalato oxidase, [E.C. 1.2.3.4], catalisa a reação:

oxalato oxidase

Foi também purificada de outras fontes como: sorgo⁽⁷¹⁻⁷³⁾, Pseudomonas sp OX-53⁽⁷⁴⁾, caruru⁽⁷⁵⁾, banana⁽⁷⁶⁾, entre outras.

A utilização da enzima oxalato oxidase apresenta algumas vantagens em relação a oxalato descarboxilase⁽⁷⁷⁾. Dentre estas, destacam-se: maior afinidade pelo substrato (menor K_M), maior ocorrência e purificação mais simples. Esta tendência pode ser facilmente comprovada através dos trabalhos publicados na última década. Por isso, esta enzima vem sendo largamente usada na confecção de kits comerciais acoplada com a enzima peroxidase de rábano^(78,79). A metodologia comercializada pela Sigma Diagnostics[®], baseia-se na medida espectrofotométrica de uma espécie que absorve em 590 nm.

PEROXIDASE



O peróxido de hidrogênio formado pela ação da oxalato oxidase, reage com 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) e com o ácido 3-(dimetilamino) benzóico (DMAB) para formar o composto de interesse. Como principais

limitações citam-se: tratamento demorado das amostras, interferência de ácido L-ascórbico e instabilidade dos reagentes mediante incidência de luz e variações de temperatura após dissolvidos. De maneira semelhante, apenas com um pouco mais de sofisticação pelo uso de antisoro para oxalato oxidase e eletrólito poli-iônico, Lathika et alii⁽⁸⁰⁾, desenvolveram recentemente, metodologia para análise de oxalato em urina.

Não há dúvida que as metodologias apresentadas pelos diversos autores, têm seus méritos e limitações em relação às determinações de ácido oxálico em amostras de urina, plasma sanguíneo e alimentos. Assim, com a inclusão de técnicas adequadas de imobilização, associadas a outras formas de detecção, pode-se melhorar de maneira significativa as proposições neste sentido.

1.2.6.1 BIOSSENSORES PARA OXALATO

Os sensores químicos são dispositivos que transformam informações químicas, como variações de concentração de alguma espécie de interesse, num sinal analiticamente útil⁽⁸¹⁾. Estes arranjos contêm duas unidades funcionais básicas - um receptor, que é a parte onde a informação é transformada numa forma de energia que possa ser medida por um transdutor, que é a segunda parte do dispositivo, capaz de converter a energia de saída do receptor num sinal de interesse analítico, geralmente, diferente do sinal de entrada.

A parte receptora dos sensores químicos baseia-se em vários princípios, como: i) princípio físico - medidas de absorvância, condutividade, temperatura, massa, etc; ii) químico - ocorrência de reações químicas com a participação do analito elevando assim o sinal analítico e iii) bioquímico - O sinal provém de processos bioquímicos. Qualquer espécie que promova eventos baseados neste último princípio, e quando intimamente acopladas a transdutores adequados, recebem o nome de biossensores. Estes incorporam um ou mais elementos biológicos para produzirem um sinal eletrônico proporcional à concentração de uma dada espécie ou um conjunto delas. Os estudos com biossensores têm sido motivados por um instinto prático, baixo custo por análise e principalmente pela alta seletividade apresentada por moléculas biológicas, como as enzimas. Grande parte dos trabalhos resultam das necessidades das áreas médica⁽⁸²⁾, bromatológica⁽⁸³⁻⁸⁵⁾ e ambiental⁽⁸⁶⁾.

Os biossensores não são apresentados como uma classe especial, porque os processos em que se baseiam, em geral, são comuns aos sensores químicos. Podem ser diferenciados de acordo com o elemento biológico usado como receptor; que pode ser: organismo, anticorpo, tecido, célula, organela, enzima e outros; como também em relação ao tipo de transdutor: potenciométrico, amperométrico, colorimétrico, etc. Por ser uma linha de pesquisa relativamente

nova e necessitar de conhecimentos multi-disciplinares, não há ainda um consenso na classificação destes.

A grande variedade de reações em meios biológicos, promovidas especificamente por espécies, também encontradas nestes meios, associada à disponibilidade de vários transdutores, fornece versatilidade frente ao desenvolvimento de metodologias analíticas⁽⁸⁷⁾.

Na construção de biossensores para análise de oxalato, geralmente são empregados como transdutores, sondas comerciais sensíveis aos gases dióxido de carbono e oxigênio, baseadas em princípios potenciométrico e amperométrico, respectivamente. Também fazem parte das elaborações destes dispositivos, eletrodos modificados, onde mede-se as correntes de decomposição de peróxido de hidrogênio, num potencial fixo de +600 mV versus Ag/AgCl. Como biocatalisadores são utilizadas duas enzimas, oxalato descarboxilase e oxalato oxidase, que são convenientemente imobilizadas e acopladas ao transdutor.

Sobre eletrodo sensível ao dióxido de carbono, alguns autores^(88,89) imobilizaram a enzima oxalato descarboxilase por meio de diversos procedimentos. De maneira geral, os dispositivos mostraram faixas úteis de trabalho um pouco restritas, tempos de resposta elevados e estabilidade da

ordem de meses. Curiosamente, esta enzima aparece com mais frequência na literatura em trabalhos publicados até 1985, envolvendo medida de dióxido de carbono. Em 1986, Guilbault et alii⁽⁹⁰⁾ imobilizaram sobre uma membrana de intestino de porco ativada com glutaraldeído a enzima oxalato oxidase, acoplando-a fisicamente à superfície de um eletrodo sensível ao oxigênio. Conseguiram faixa útil de trabalho para análises em urinas, não havendo a necessidade do pré-tratamento das amostras. O biossensor manteve-se estável, com cerca de 80% da atividade inicial após 50 dias de uso. De maneira semelhante, Dinckaya e Telefoncu⁽⁹¹⁾, desenvolveram um biossensor com o elemento biológico imobilizado em gelatina, com desempenho analítico semelhante ao anterior.

A maior parte dos trabalhos com biossensores para oxalato, baseiam-se na determinação do peróxido de hidrogênio, obtido pela ação da enzima oxalato oxidase extraída de cevada, principalmente. Nestas determinações, o material bioativo é imobilizado em várias matrizes como colágeno⁽⁹²⁾, poliamida⁽⁹³⁾ e PVC, acetato de celulose e policarbonato⁽⁹⁴⁾ e o conjunto colocado fisicamente em eletrodos como platina, carbono vítreo, ouro, etc. Estas membranas apesar de aumentarem a resistência elétrica na matriz são indispensáveis para as medidas com amostras reais. Além do que, no potencial

necessário para decompor a água oxigenada, as interferências causadas por compostos orgânicos são bastante significativas.

Nos trabalhos anteriores, os autores empregaram enzimas purificadas e imobilizadas para análise de oxalato. Diferentemente, Glazier e Rechiniz⁽⁹⁵⁾, imobilizaram tecidos de caule de beterraba numa matriz de pasta de carbono. A corrente gerada pela decomposição do peróxido foi acompanhada a +650 mV versus Ag/AgCl e constataram a viabilidade de se usar materiais “in natura” em determinações, com razoável estabilidade. Mesmo com um caráter puramente acadêmico, este trabalho foi um marco em relação aos dispositivos apresentados para análise de oxalatos. Tal trabalho aliado a uma visão de otimização⁽⁹³⁾, pode apontar decisivamente no sentido da resolução dos problemas encontrados em amostras reais. Outro trabalho com estas características⁽⁹⁶⁾, avalia o desempenho de dois biossensores, um amperométrico e outro potenciométrico, onde utilizou-se a enzima de tecido de banana, parcialmente purificada em acetona. Os resultados obtidos sugerem um melhor desempenho do biossensor amperométrico, quando considerados limites de detecção e tempo de resposta. De maneira semelhante Rechiniz e Bradley⁽⁹⁷⁾, fizeram as mesmas constatações num trabalho muito semelhante publicado no mesmo ano.

A utilização destes dispositivos como ferramentas para análises em química analítica tem ganho maior espaço na literatura, principalmente quando estão envolvidos os analitos, glicose e lactato. No caso especial de ácido oxálico, a necessidade de automatização, uma consequência da demanda e instabilidade das amostras, tem levado alguns autores a seguirem por este caminho.

I.2.6.2 ENZIMÁTICOS POR FIA

A análise por injeção em fluxo, introduzida pela primeira vez por Ruzicka, a 20 anos atrás, tem como principais características de desempenho: frequência de análise, baixo custo, pouco consumo de amostra, medidas feitas fora do equilíbrio e a possibilidade de determinações simultâneas. Para isto, várias configurações foram apresentadas, especificamente visando análises de ânions⁽⁹⁸⁾. Estas metodologias podem ser classificadas de acordo com o tipo de detecção empregada, portanto: potenciométricos, amperométricos, colorimétricos, etc. A grande vantagem de se usar as estratégias em fluxo está associada à possibilidade de acompanhamento “in vivo”, oferecendo resultados mais confiáveis. As determinações enzimáticas em fluxo, de espécies de interesses bromatológico⁽⁹⁹⁾ e clínico⁽¹⁰⁰⁾, geralmente envolvem reatores com

enzimas imobilizadas nas mais diversas formas, ou biossensores, ou enzimas com mediadores⁽¹⁰¹⁾.

Em alguns trabalhos encontrados na literatura, a enzima oxalato oxidase foi imobilizada e adaptada a um sistema de fluxo com detecção colorimétrica⁽¹⁰²⁻¹⁰⁵⁾. Nestes, observaram interferência de ácido ascórbico e foram aplicados com relativo sucesso em amostras de urina. A oxalato descarboxilase, também citada^(67,106-108), apresenta como desvantagens, sistemas de fluxo complicados e a necessidade de uma segunda enzima.

Duas estratégias, baseadas no fenômeno da luminescência, mostraram-se eficientes em determinações de ácido oxálico em amostras de urina e plasma. Na primeira⁽¹⁰⁹⁾, mediu-se a luminescência da espécie NADH, gerada pela decomposição do analito pela ação catalítica das enzimas oxalato descarboxilase e formiato desidrogenase. Na segunda⁽¹¹⁰⁾, num reator enzimático, a oxalato oxidase reagiu com o analito, obtendo-se o sinal analítico pela reação luminescente entre peróxido de hidrogênio, luminol e hexacianoferrato(III). Estes procedimentos mostraram-se úteis para os fins propostos, apenas com uma limitação, frequência de análise. Uma metodologia amperométrica⁽¹¹¹⁾, também com a enzima oxalato oxidase, imobilizada num

sistema de fluxo, foi aplicada para análises de soluções padrões de ácido oxálico.

Uma série de trabalhos que não utilizam enzimas para determinações de ácido oxálico tem motivado alguns autores a desenvolverem procedimentos em fluxo com medidas: amperométricas⁽¹¹²⁻¹¹⁴⁾, colorimétricas^(115,116), fluorimétricas⁽¹¹⁷⁾, luminescência^(118,119) e de massa⁽¹²⁰⁾. Em praticamente todos, são necessárias etapas de precipitação com íons cálcio e filtração, e apresentam sistemas de fluxo pouco funcionais ou não são aplicáveis na resolução de amostras reais. Considerando-se as vantagens e desvantagens oferecidas pelos métodos enzimáticos e não enzimáticos, certamente, que a prioridade recai sobre os primeiros.

I.3 OBJETIVOS DA TESE

Pautado na relevância dos oxalatos nos meios biológicos bem como na necessidade de desenvolvimento de novas metodologias analíticas, pode-se, dentro de uma visão moderna, imputar os seguintes objetivos:

- 1) Imobilizar enzimas em matrizes naturais para análises de oxalato.
- 2) Determinar oxalato por via enzimática, quantificando dióxido de carbono.
- 3) Definir arranjos experimentais de análise por injeção em fluxo.
- 4) Construir e avaliar biossensores.

II. PARTE EXPERIMENTAL

II.1 SOLUÇÕES E PADRÕES

NAS MEDIDAS COM ELETRODO SENSÍVEL A CO_2 -“*solução 100 mmol / L de ácido oxálico*” - Foi preparada dissolvendo-se quantidade adequada do sólido($\text{COOHCOOH}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), numa solução 0,10 mol / L de cloreto de potássio (Merck) ou nos outros meios de medida. “ *soluções tampões*” - Nos estudos do efeito de pH sobre a resposta do eletrodo com o reator enzimático, o intervalo de pH compreendido entre 1,0 e 5,2 foi investigado fazendo-se uso das seguintes soluções tampões, na concentração de 0,05 mol / L : pH 1,0 e 1,8 \rightarrow KCl/HCl; pH 2,5 \rightarrow Glicina/HCl e de pH 3,1 a 5,2 \rightarrow ácido succínico/NaOH.

NAS MEDIDAS EM FLUXO - Em todas as medidas utilizou-se água desionizada no aparelho Nanopure[®], que forneceu o solvente com 17,8 M Ω . Reagentes de grau analítico fizeram parte de todas as preparações.

Nas medidas em fluxo com detecção condutométrica, empregou-se água desionizada nas vias carregadora e de detecção. As soluções padrões de ácido oxálico foram preparadas por diluição em dihidrogenofosfato de sódio, 0,05 mol / L, em pH 3,00 ajustado com ácido fosfórico. No intervalo de concentração considerado, não houve variação maior do que 0,02 unidades de

pH. O mesmo meio foi adotado para as medidas do efeito do pH sobre o sinal analítico.

Nas análises de urina pelo método da adição de padrão, volumes adequados de solução, 10 mmol / L em ácido oxálico, foram adicionados às amostras previamente diluídas e injetadas no sistema com detecção condutométrica.

Como via carregadora para as medidas em fluxo com detecção espectrofotométrica, empregou-se o tampão ácido succínico-NaOH 0,05 mol / L, pH 4,00 e contendo etilenodiaminotetracetato de dissódio (Merck). De maneira semelhante ao procedimento anterior, os padrões também foram preparados por diluição neste meio. Posteriormente ao reator enzimático, utilizou-se uma solução de ácido fosfórico 1,0 mol / L em confluência com a via carregadora. Além disso, preparam-se as soluções de púrpura de bromo cresol (PBC), pesando-se 0,27 g do sólido, dissolvendo-o em 20 mL de etanol absoluto e completando-se o volume para 500 mL com água destilada previamente desaerada por aquecimento. Desta forma obteve-se uma solução estoque, $1,0 \times 10^{-3}$ mol / L, a qual foi diluída com o mesmo solvente e de acordo com a concentração desejada. O pH foi ajustado a 7,00 pela adição de hidróxido de sódio diluído, de tal forma a não provocar mudança significativa

no volume da solução, e armazenada em recipiente fechado. Preparou-se um volume de 2L de solução para serem utilizados diariamente.

NAS MEDIDAS COM O BIOSSENSOR - Para o estudo do efeito da variação do pH, na faixa de 3,0 a 7,0 , utilizaram-se soluções tampão ácido succínico-NaOH, 0,05 mol / L e solução tampão fosfato, ambas contendo 1,0 mmol / L de Na₂H₂EDTA respectivamente, saturados com oxigênio do ar, por cerca de 12 horas antes do uso.

No estudo das interferências orgânicas manteve-se a mesma concentração de $2,0 \times 10^{-4}$ mol / L para L-lisina (Aldrich), L-cistina (Aldrich), ácido láctico (Merck) e ácido L-ascórbico (Sigma). Já para os estudos da influência de íons metálicos, como Al³⁺, Fe²⁺ e Cu²⁺ na ausência e na presença do sal dissódico de EDTA, 1,0 mmol / L, a concentração dos íons foi fixada em $5,0 \times 10^{-4}$ mol / L.

O biossensor foi lavado por três vezes, sob agitação vigorosa, com o novo meio de medida e antes das leituras definitivas. O dispositivo foi armazenado a 5^oC quando fora de uso.

II.2 MATERIAIS E APARELHAGEM

Os eletrodos sensíveis ao dióxido de carbono são empregados, ou para medir a concentração deste em soluções, ou em fases gasosas. Como

membrana de permeação. utiliza-se politetrafluoretileno (PTFE), com tamanho de poros controlados para se obter seletividade. Na Figura II.1, ilustra-se o ele-

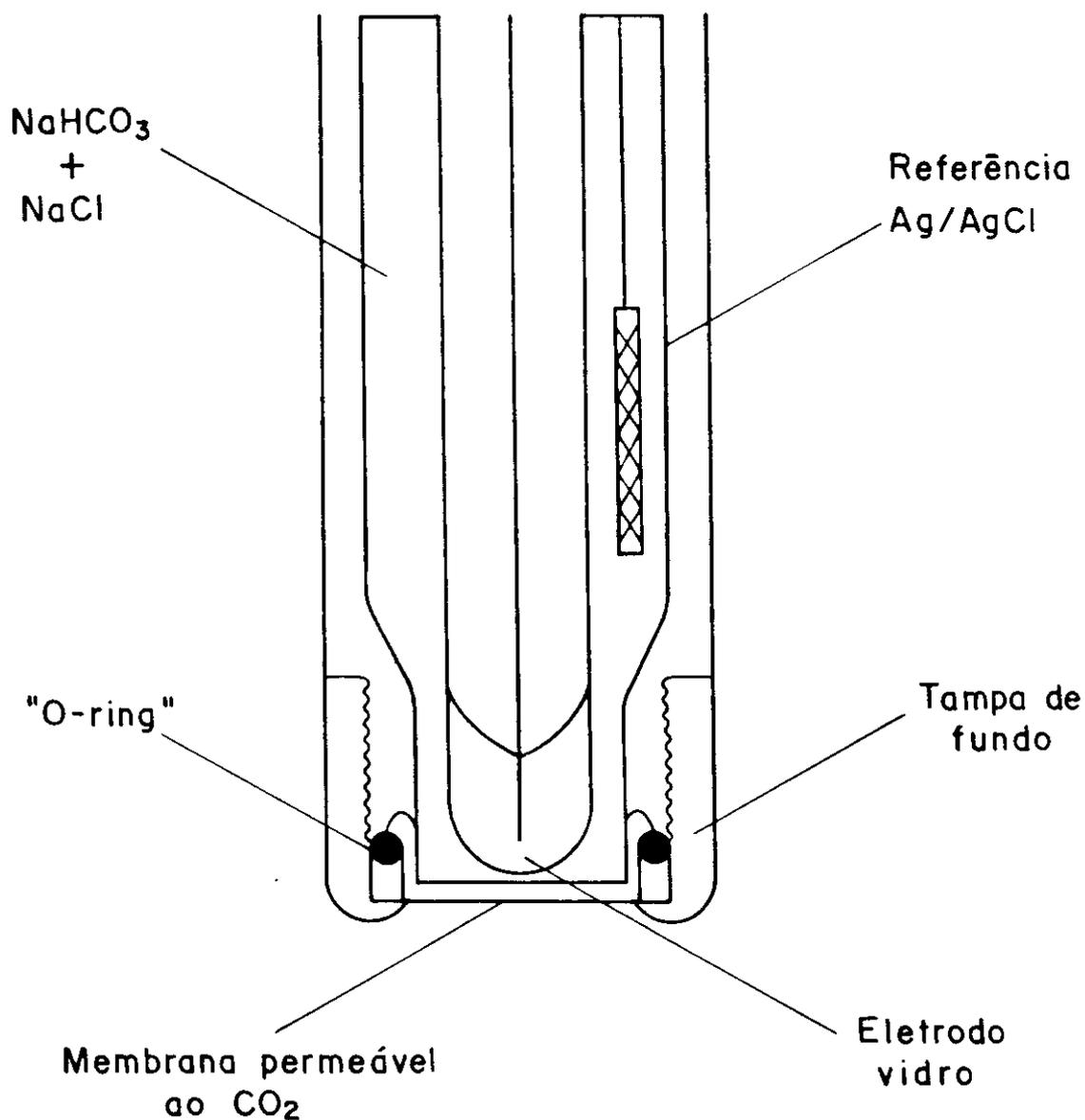


Figura II.1 - Detalhes de um eletrodo comercial sensível a dióxido de carbono.

trodo combinado, onde a membrana de vidro em contato íntimo com a de permeação, é o eletrodo de trabalho e como referência Ag/AgCl. Este conjunto está mergulhado numa solução diluída de NaHCO₃ / NaCl. Quando numa solução sob pressão parcial de dióxido de carbono, este permeia através da membrana, passando para a solução interna e ocorrendo assim um equilíbrio entre estas fases líquidas. Como consequência, ocorre uma mudança na solução interna :



que será detectada pelo eletrodo combinado de vidro.

O dióxido de carbono, produto da reação enzimática que converte ácido oxálico em presença de oxigênio, pode ser monitorizado através de eletrodo sensível a este gás. Desta maneira, pelo acoplamento deste sensor com a enzima oxalato oxidase, com seletividade ao produto (CO₂) e ao substrato (COOHCOOH), respectivamente, obtém-se uma boa performance quando se compara com outros métodos.

Como eletrodo foi empregado o modelo OP- 9353 da Radelkis, Hungria. Este sensor fez parte do conjunto de medida ilustrado na Figura II.2.

No reator enzimático cilíndrico e agitado, dez sementes de sorgo cortadas e pré-embebidas em KCl, foram mantidas no compartimento com o auxílio de uma rede de Nylon[®] na parte superior. O eletrodo e o reator foram introduzidos numa câmara de vidro isolada e termostaticada externamente através de um banho d'água provido de circulação (Colora-Alemanha). Após o uso, as sementes foram lavadas, secas a temperatura ambiente e guardadas a 5°C.

Para os estudos envolvendo FIA utilizou-se bomba peristáltica Ismatech[®], modelo mp13 GJ4; condutivímetro Micronal, modelo B-331 com potenciômetro de ajuste de off set; espectrofotômetro de feixe único provido de cela de fluxo de 1,00 cm de caminho óptico, Zeiss PM 2D; um injetor comutador automático, Micronal[®] B352 e um registrador Cole-Parmer[®] série 9375.

Nas medidas condutométricas em fluxo empregou-se a célula ilustrada na Figura II.3⁽¹²¹⁾.

Para controle dos fluxos foram utilizados tubos de Tygon[®] Technicon de diversos diâmetros e as medidas de velocidade de fluxo, feitas nos finais de cada via. Os demais segmentos das vias foram construídos com tubos de polietileno[®], com 0,7 mm de diâmetro interno.

O sistema de permeação⁽¹²²⁾ para o dióxido de carbono consistiu de duas peças em acrílico, com um sulco de aproximadamente 0,5 mm de profundidade

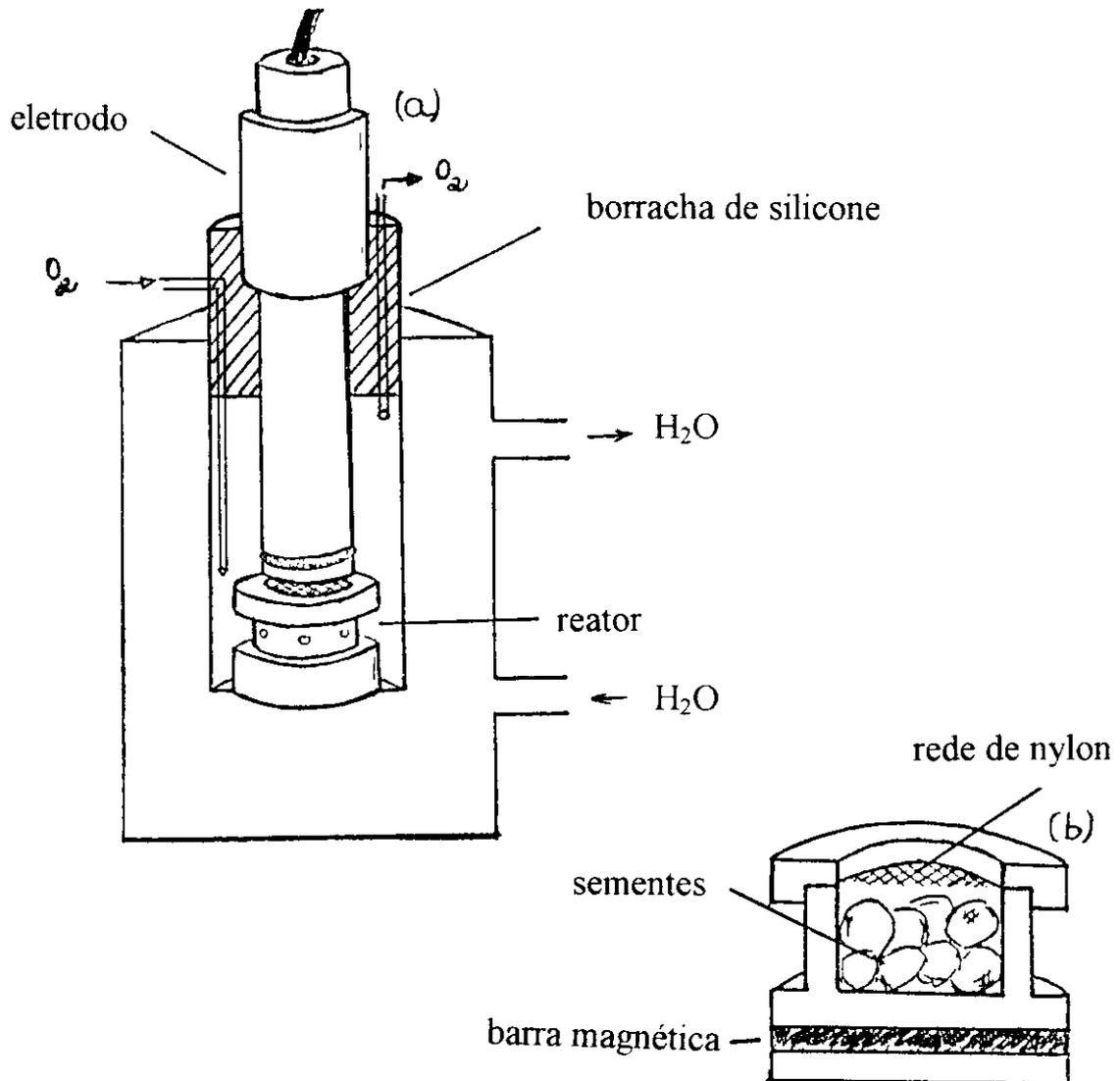


Figura II.2 - Esquema de célula de medida montada com eletrodo sensível ao CO_2 e oxalato oxidase naturalmente imobilizada no sorgo. (a) visão geral e (b) reator enzimático em corte.

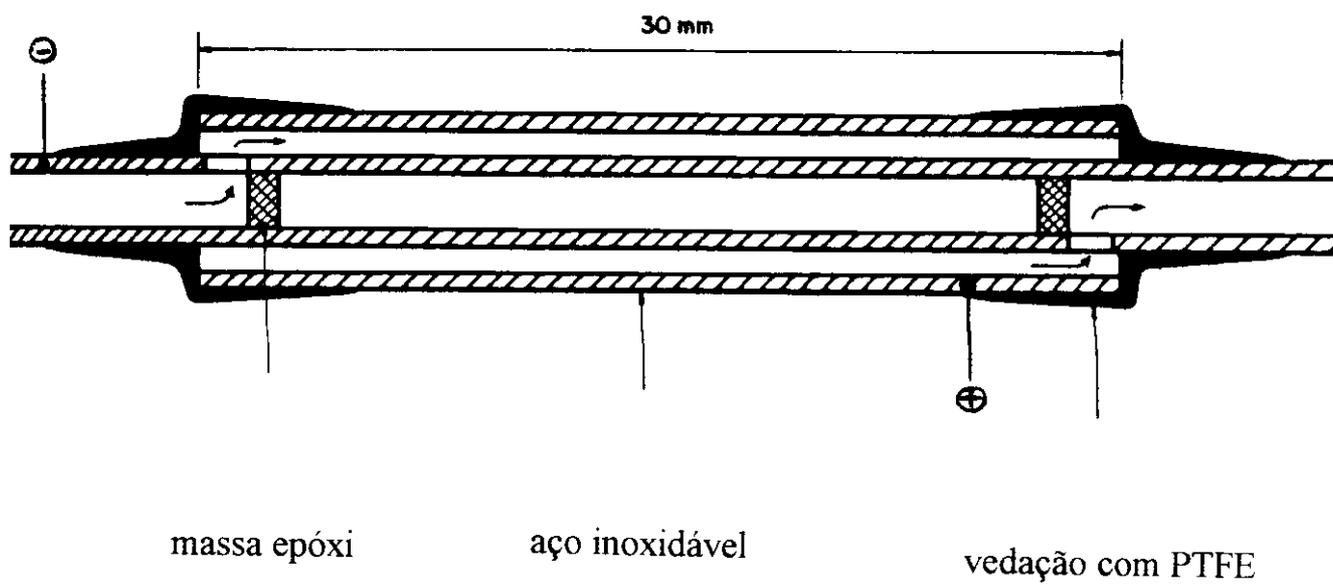


Figura II.3 - Célula condutométrica para análise por injeção em fluxo. Volume interno $\approx 25 \mu\text{L}$ e constante de $0,186 \Omega \text{ cm}^{-1}$.

por 100 mm de extensão, em cada uma delas, separadas por uma membrana de teflon[®] esticada. As duas partes foram apertadas firmemente com oito parafusos e porcas tipo borboleta. Em cada um dos lados fluíram as diferentes soluções para cada metodologia considerada.

Para manter a solução de púrpura de bromocresol livre do dióxido de carbono proveniente do ar, fez-se uso do esquema de proteção desenhado na Figura II.4⁽¹²³⁾.

No biossensor, empregou-se como fontes das enzimas oxalato oxidase e peroxidase, cevada ativada com quantidades adicionais de enzima e pedaços de “nabo”, respectivamente. Como sensor de oxigênio, utilizou-se um eletrodo FAC[®], medindo 60 mm de comprimento por 10 mm de diâmetro, inserido numa célula de vidro termostatizada por banho circulador, conforme a Figura II.5. O princípio de funcionamento do eletrodo pode ser notado na Figura II.6, onde a reação anódica gera uma corrente proporcional à pressão parcial do gás permeado. O oxigênio do ar foi borbulhado em soluções de água de barita e de hidróxido de sódio e por água antes de atingir a célula de medida. As aparelhagens utilizadas foram: Banho circulador → Colora[®]- Alemanha, Oxímetro → FAC[®] modelo 204 A, Agitador magnético → Methrom-Herisau, e Banho termostatizado → Fanem[®] modelo 100.

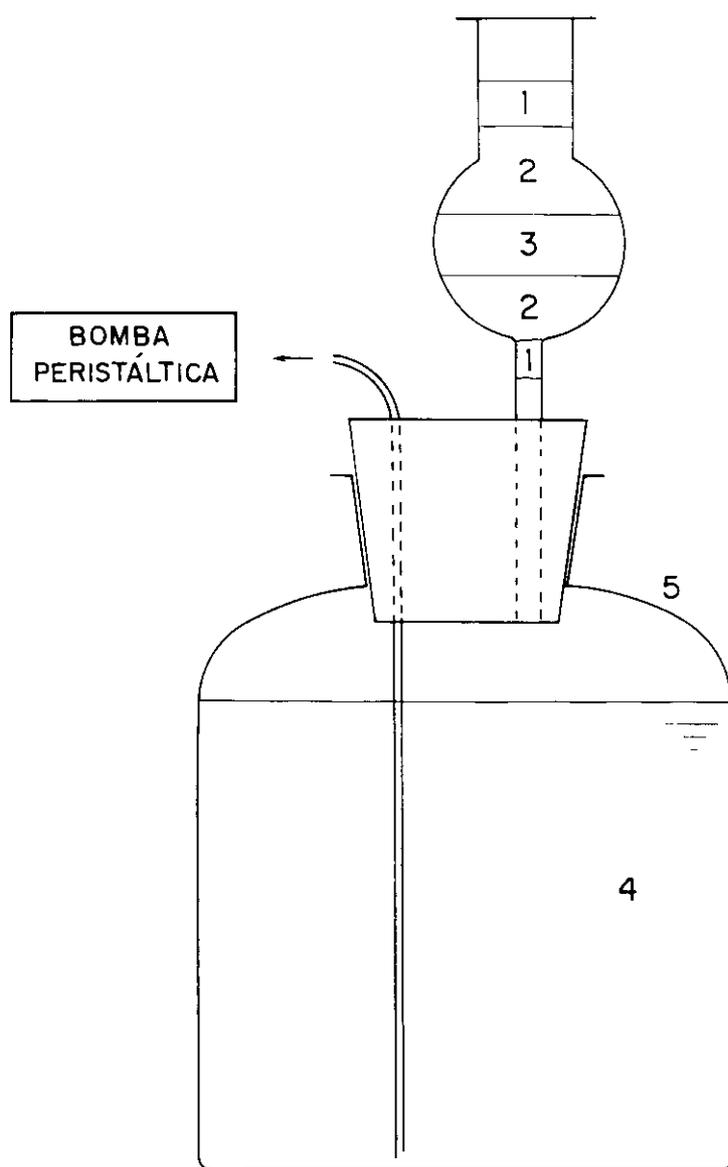


Figura II.4 - Dispositivo para proteção em relação ao dióxido de carbono, proveniente do ar, para medidas em FIA com detecção espectrofotométrica. (1)→ algodão, (2)→ cloreto de cálcio, (3)→ hidróxido de sódio, (4)→ solução de púrpura de bromocresol e (5)→ recipiente com capacidade para 2 L.

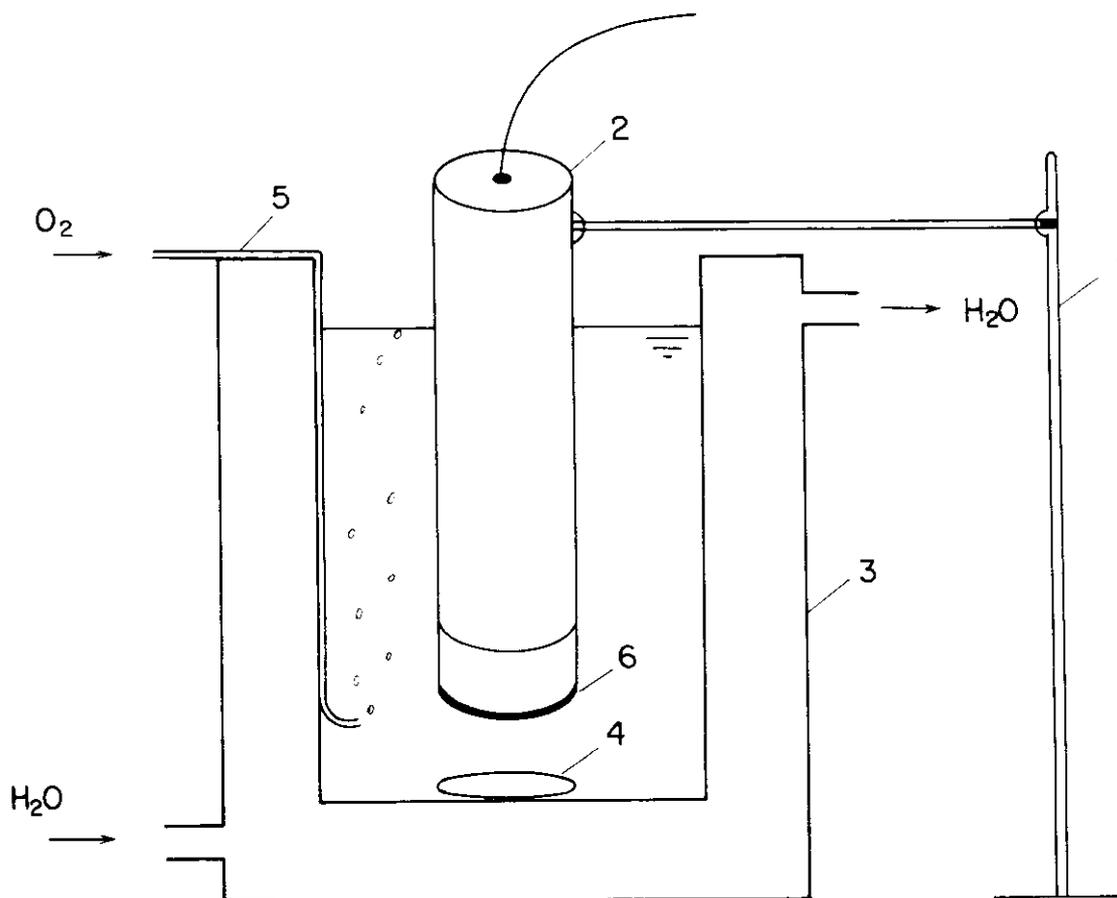


Figura II.5 - Montagem usada para medida de oxigênio consumido na reação enzimática do ácido oxálico. (1)→ suporte com garra para o eletrodo, (2)→ eletrodo, (3)→ célula termostatizada por banho circulador externo, (4)→ barra magnética, (5)→ borbulhamento de oxigênio do ar livre de CO_2 e (6)→ material bioativo.

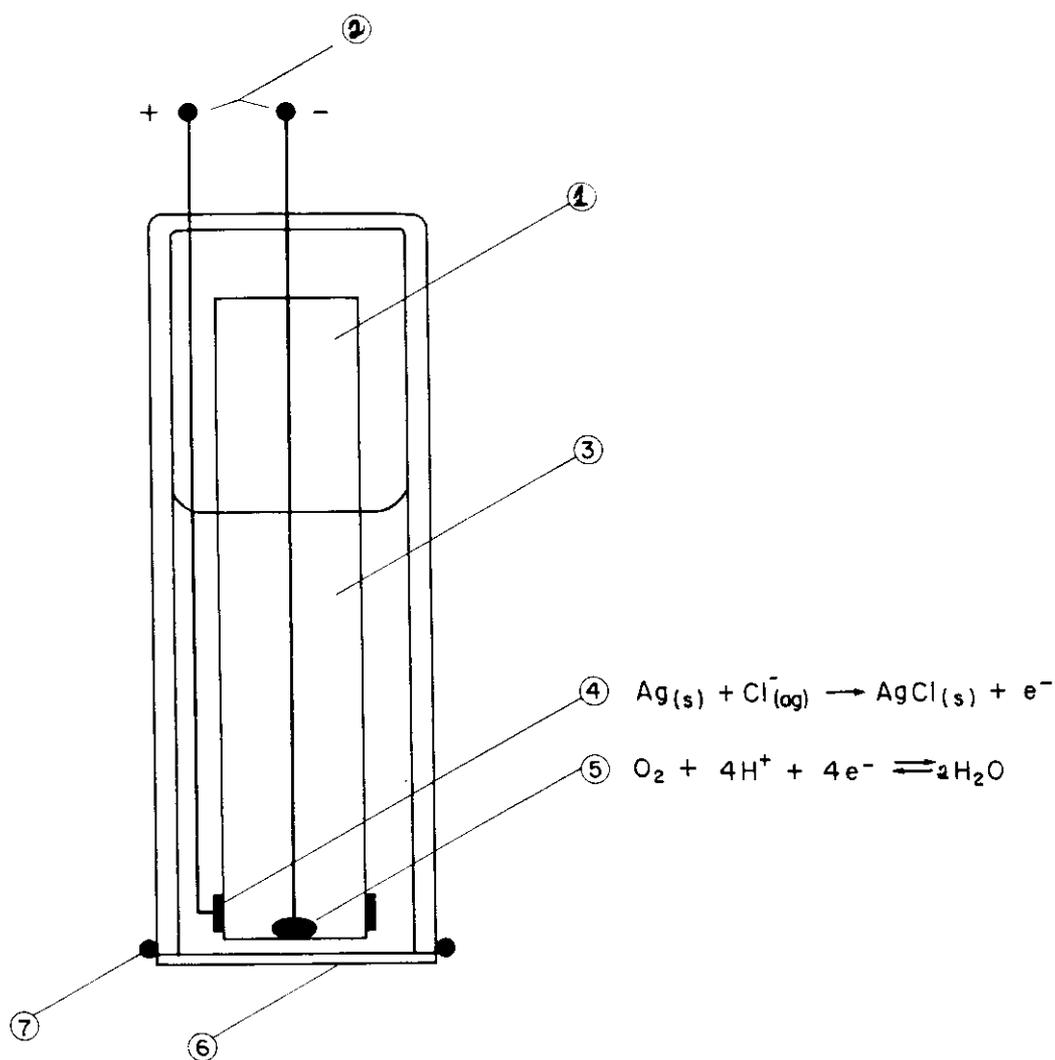


Figura II.6 - Eletrodo comercial tipo Clark sensível ao oxigênio. (1)→ isolante, (2)→ terminais, (3)→ solução de KCl tamponada, (4)→ disco de prata com a reação anódica, (5)→ disco de platina e a reação no cátodo, (6)→ membrana permeável e seletiva ao oxigênio e (7)→ “O-ring”.

II.3 IMOBILIZAÇÕES ENZIMÁTICAS

As enzimas normalmente necessitam de etapas elaboradas e dispendiosas de purificação, por ocorrerem naturalmente misturadas a uma grande variedade de moléculas biológicas. Na maioria das vezes são empregadas na forma solúvel, como em biotecnologia, química ambiental, diagnóstico clínico e controle de processos. Os ensaios deste tipo são destrutivos, requerendo tempos prolongados e grandes quantidades de enzimas purificadas. Por outro lado, com a imobilização adequada destes materiais, tanto em matrizes artificiais como naturais, pode-se obter maior estabilidade, menor custo por análise e principalmente, a possibilidade de automatização do sistema analítico.

II.3.1 MATRIZES INORGÂNICAS

“glass beads” - Pesou-se 1,0g deste material 60 a 80 mesh (Mikrotec[®]), acrescentaram-se 18 mL de água destilada e 2,0 mL de p-aminopropiltriétoxissilano (Aldrich) 10% v/v, ajustando o pH entre 3,0 e 4,0. As esferas de vidro foram deixadas em banho de água a 75°C por duas horas, filtradas em funil de vidro sinterizado, lavadas com 20 mL de água destilada e secas a 115°C por quatro horas. As esferas de vidro silanizadas foram lavadas várias vezes com água destilada e ativadas com 25 mL de uma solução 3%

m/m de glutaraldeído. O material foi colocado em dessecador a vácuo, à temperatura ambiente, por quinze minutos. Foi deixado por uma hora, decantado e lavado três vezes com água destilada. Em seguida adicionou-se 15,0 mL de solução tampão ácido succínico-NaOH 0,05 mol / L, pH 3,8; e deixou-se secar à temperatura ambiente. Dissolveu-se 5,00 mg da enzima oxalato oxidase (E.C. 1.2.3.4 Sigma Chemical Co.) 1,2 U / mg, em 500 µL do tampão succinato. A esta suspens

ão foi adicionado o material ativado e deixou-se todo sistema a 5⁰C por vinte e quatro horas sob agitação lenta. Antes do uso, a matriz com a enzima imobilizada foi lavada com tampão várias vezes e mantida sob refrigeração quando fora de uso. Alternativamente, o mesmo material foi submetido à silanização em meio não aquoso, pesaram-se 5,0 g de “glass beads”, adicionaram-se 2,0 mL de p-aminotrietoxisilano (Aldrich) e 25 mL de tolueno (Merck). O meio reacional foi submetido a alto vácuo, temperatura de 80°C e deixado refluir por três horas. Após este procedimento, lavou-se várias vezes com tolueno, éter dietílico (Merck), água destilada e, finalmente, foi seco em estufa regulada a 80°C por quatro horas. No que se refere a ativação e imobilização, o procedimento adotado foi o mesmo descrito para meio aquoso.

“glass beads” - Ferveu-se 1,0g de “glass beads” com 30 mL de uma solução 5% v/v de HNO₃ (Carlo Erba), sob agitação durante uma hora, filtrou-se a vácuo, lavou-se diversas vezes com água destilada e seco a 95°C por duas horas. As bolas de vidro limpas foram adicionadas a uma solução contendo 5,0 mL de p-aminopropiltriétoxissilano (Aldrich) em 45 mL de tampão acetato 0,05 mol / L; pH 5,0. Aqueceu-se em banho d’água, a 95°C por duas horas, com agitação moderada a cada quinze minutos. O material foi então filtrado, lavado com água destilada e seco em estufa a 95°C por doze horas. Juntou-se ao vidro silanizado, 50 mL de uma solução 15% m/m de glutaraldeído em tampão pirofosfato 0,10 mol / L, pH 8,5; agitou-se cuidadosamente por uma hora a temperatura ambiente, filtrou-se, lavou-se com água destilada e eliminou-se a umidade em dessecador. Cerca de 200 mg do material obtido foi colocado em contato com uma suspensão da enzima oxalato oxidase (Sigma Chemical Co.), contendo 25 U / 500µL do tampão succinato 0,05 mol / L pH 3,8; durante uma noite. Utilizou-se este material para construir os reatores enzimáticos dos sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA).

“sílica organofuncionalizada” - A sílica contendo grupos amino (NH₂) foi ativada e a enzima imobilizada seguindo o procedimento: a 1,0 g deste material colocou-se 50 mL de uma solução 10% m/m de

glutaraldeído em tampão fosfato 0,05 mol / L, pH 7,0; agitou-se cuidadosa e intermitentemente por oito minutos. Descartou-se o sobrenadante, lavou-se três vezes com o mesmo tampão e com tampão succinato. Preparou-se a suspensão de oxalato oxidase 10 U / mL que foi adicionada à sílica ativada. Armazenou-se a 5°C por uma noite. Desta forma, obteve-se a enzima imobilizada para a construção dos dispositivos de medida do ácido oxálico.

II.3.2 ÁLCOOL POLIVINÍLICO⁽¹²⁴⁾

As sementes de Sorghum vulgare, variedade BR 303 fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Sorgo e Milho da EMBRAPA, Sete Lagoas-MG, foram pulverizadas com o auxílio de almofariz e pistilo, passadas por uma peneira Granutest[®] (abertura 0,35 mm USBS 45), obtendo-se desta maneira um pó fino. Preparou-se solução aquosa 10% m/v de álcool polivinílico (FLUKA), por aquecimento até dissolução completa e deixado esfriar até a temperatura ambiente. Pesou-se 200 mg do sorgo pulverizado, adicionou-se 10,0 mL da solução de APV, agitando-se vigorosamente até homogeneização completa. A mistura foi vertida em placas de petri de 10,5 cm de diâmetro, previamente esterilizadas. As placas com o material foram submetidas à radiação ultra violeta por noventa minutos. Após adquirir boa consistência, o gel foi separado, cortado em círculos ($\varnothing \approx 3$ mm) e lavado com

jatos de água destilada fria por duas horas. Este material foi empregado para construção de biossensores e reatores enzimáticos.

II.3.3 QUITINA⁽¹²⁵⁾

Num béquer de 50mL, pesou-se 0,50g de quitina (Sigma), adicionou-se 18 mL de tampão ácido succínico-NaOH 0,05 mol / L, pH 3,8; agitou-se por dois minutos para hidratação e colocou-se 2,0 mL de uma solução 25% m/m de glutaraldeído. Deixou-se sob agitação por duas horas, lavou-se quatro vezes com água destilada e acrescentou-se ao material ativado a suspensão enzimática (10 U / mL).

II.3.4 MATRIZ NATURAL

Sementes de sorgo foram lavadas com água destilada, cortadas em quatro partes e deixadas mergulhadas numa solução 0,10 mol / L de KCl, ou em soluções tampões 0,05 mol / L. Este material contendo a enzima naturalmente imobilizada foi empregado na construção do reator tipo “stirring bar”. Neste tipo de estratégia, usou-se o eletrodo sensível a CO₂, onde foram testados vários tempos de condicionamento em solução de KCl. Como fonte da enzima peroxidase empregou-se tecido de tubérculo de Armoracia rusticana cortado em pequenos pedaços para acoplamento com o eletrodo sensível ao oxigênio na construção do biossensor bienzimático.

II.3.5 MATRIZES NATURAIS ATIVADAS

Dez gramas de sementes de Sorghum vulgare e de cevada foram triturados em almofariz com pistilo e passadas por uma peneira Granutest[®], abertura de 1 mm. Os pedaços foram lavados com água destilada, secos e mergulhados numa solução 25 % m/m de glutaraldeído e guardados a 5^oC durante uma noite. Descartou-se o sobrenadante, lavou-se dez vezes com água destilada, quatro vezes com uma solução 0,10 mol / L de glicina (Carlo Erba) e novamente com água por quatro vezes. Dissolveu-se 13 U / mL de oxalato oxidase em tampão ácido succínico-NaOH 0,05 mol / L, pH 3,8; dividiu-se em duas porções de 1 mL e a cada uma, colocou-se 1,0 g dos materiais naturais ativados, deixando-as uma semana na geladeira. As sementes de sorgo contendo a enzima foram empregadas na construção de reatores para o sistema em fluxo condutométrico e colorimétrico enquanto que a cevada, destinou-se a confecção do biossensor bi-enzimático.

Nas medidas em FIA com detecção espectrofotométrica outro reator enzimático foi montado. Dissolveram-se cuidadosamente, 3 U de oxalato oxidase mais 100 U de peroxidase, provenientes do kit para determinação de oxalato, em 500 µL de tampão ácido succínico-NaOH e deixadas em contato com 2,0g de sorgo, ativados previamente nas mesmas condições já citadas.

II.4 MEDIDAS COM ELETRODO SENSÍVEL A CO₂

“metodologia” - Colocaram-se 5,0 mL das soluções previamente saturadas com oxigênio do ar e livre de dióxido de carbono, deixando-se sob agitação, até obtenção de um valor constante de potencial. Em seguida, com o auxílio de uma micropipeta Finnpipette[®], acrescentaram-se volumes adequados de soluções mais concentradas de ácido oxálico, preparadas nos respectivos meios de estudo, para se chegar às concentrações finais desejadas. Depois da adição do substrato, cronometrou-se e anotou-se a variação de potencial (Δ mV) num tempo fixo para todas as medidas. Ao término de cada procedimento, o reator foi submetido a limpeza com tampão ou KCl, com agitação vigorosa, por cinco minutos e por três vezes.

“medidas em fluxo” - Os dois esquemas de fluxo utilizados com o eletrodo estão representados na Figura II.7. Em ambos, fluxos de 0,5 mL / min, gerados por uma bomba peristáltica (Milan[®] modelo 206), passaram por um reator enzimático constituído por sementes de sorgo, pré-acondicionadas por doze horas nos meios de estudo. As dimensões do reator foram : 10 cm de comprimento por 0,4 cm de diâmetro interno. Utilizou-se uma alça de amostra de 100 μ L, sendo o substrato inserido na via carregadora através de injetor comutador manual construído no laboratório.

II.5 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)

As duas metodologias propostas baseiam-se nas propriedades ácidas do dióxido de carbono em água. Na primeira, o CO_2 , produto da reação enzimática, muda a condutividade da água, como consequência da formação dos íons bicarbonato e hidroxônio de alta mobilidade. Na segunda, o mesmo gás, desloca o equilíbrio ácido-base do indicador púrpura de bromo cresol (PBC) no sentido da espécie protonada.

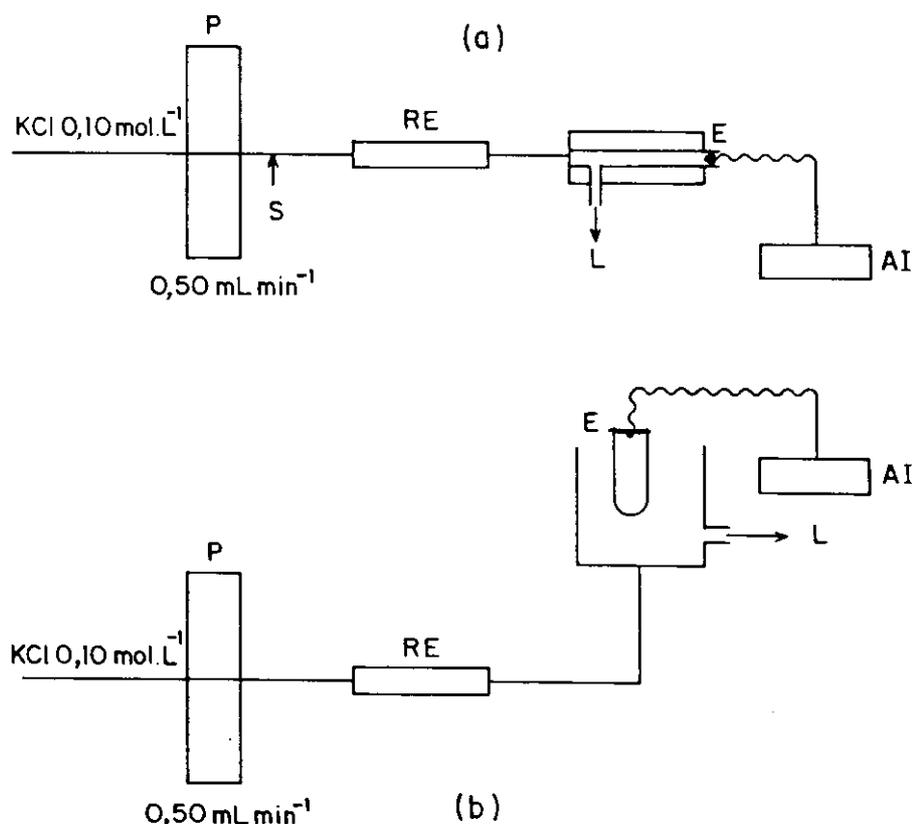


Figura II.7 - Sistemas em fluxo com eletrodo sensível ao dióxido de carbono.

(a) Eletrodo disposto horizontalmente em relação ao fluxo e com compartimento de medida de $50\mu\text{L}$. (b) Jato sobre a superfície do eletrodo, disposto verticalmente em relação ao fluxo. P, bomba peristáltica; S, amostra; RE, reator enzimático; AI, analisador de íons; E, eletrodo e L, lixo.

Tal deslocamento promove diminuição da absorção espectral na região do visível relativa a espécie desprotonada, que apresenta um máximo de absorção

em 540 nm. Tanto a metodologia com princípio condutométrico, como espectrofotométrico, mostraram-se atrativas, quando consideradas a seletividade e aplicabilidade em matrizes complexas como urina e alimentos, por apresentarem um sistema de permeação que separa as vias carregadora da de detecção.

II.5.1 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

“urinas” - Duas amostras de urina liofilizadas, de adultos masculinos excretadas durante 24 horas, compradas da Sigma, com concentrações em ácido oxálico, normal, N e elevada, E; foram reconstituídas na solução de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ pH 3,00 e injetadas diretamente na via carregadora. As outras três amostras de doadores masculinos adultos, foram diluídas na proporção de 1:1 em NaH_2PO_4 0,10 mol / L pH 3,00 e também injetadas. As porções de amostras não utilizadas foram congeladas e descartadas após um mês da coleta. Da mesma forma, só foram consideradas as preparações diárias.

Segundo o procedimento da Sigma nº 591 : Pipetam-se 5,0 mL de urina, dilui-se no mesmo volume de tampão pH 7,6; contendo 10 mmol / L de EDTA e ajusta-se o pH entre 5,0 e 7,0. Colocam-se 2,0 mL de amostra diluída em tubo para centrifuga contendo carvão ativado, mistura-se por cinco minutos e centrifuga-se a 1500g, por cinco minutos, ou filtra-se com papel Whatman®.

“*capins*” - Em canteiros de aproximadamente 4 m² coletaram-se folhas jovens de cinco espécies de capim acondicionando-as em sacos de papel. Imediatamente, após a amostragem, os capins foram pesados e introduzidos em estufa com ventilação, a 60°C e durante 48 horas. Em seguida, foram esfriadas à temperatura ambiente e rapidamente pesadas. Finalmente, foram pulverizadas em moinho de facas, guardados em sacos plásticos e identificados. As massas obtidas encontram-se na Tabela II.1.

Tabela II.1 - Variedades de capins com respectivas massas no momento da amostragem (m_c), após o processo de secagem (m_s) e analisada (m_a).

VARIEDADE DE CAPIM*	m_c (g)	m_s (g)	m_a (mg)
Tanner Glass®	163,0	51,0	216
Tifton 85®	162,0	50,0	233
<u>Setaria splendida</u>	314,0	73,0	217
<u>Setaria anseps</u>	216,0	53,0	205
<u>Brachiaria decumbens</u>	207,0	64,0	257

*amostras coletadas dia 11/04/95 das 8-10 horas na cidade de Botucatu/SP

Determinou-se o teor de ácido oxálico em todas amostras, com base em metodologias condutométrica e espectrofotométrica, para urina e capim, respectivamente. As urinas tratadas mediante procedimento 591 da Sigma foram destinadas apenas às análises espectrofotométricas do analito, usando a enzima solubilizada e como método comparativo.

II.5.2 PROCEDIMENTO ANALÍTICO CONDUTOMÉTRICO

Como reator enzimático empregou-se um tubo de polietileno com 2 mm de diâmetro interno por 100 mm de comprimento que foi preenchido com cerca de 273 mg de Sorghum vulgare ativado com quantidade adicional de oxalato oxidase. Este reator enzimático (RE) foi inserido num sistema de fluxo de acordo com o ilustrado na Figura II.8. Injetaram-se 200 μ L das soluções padrão de ácido oxálico, bem como amostras de urina, que ao passarem pelo reator, produziam dióxido de carbono, que permeou através da membrana de politetrafluoretileno (PTFE), promovendo a mudança de condutividade na via oposta à membrana.

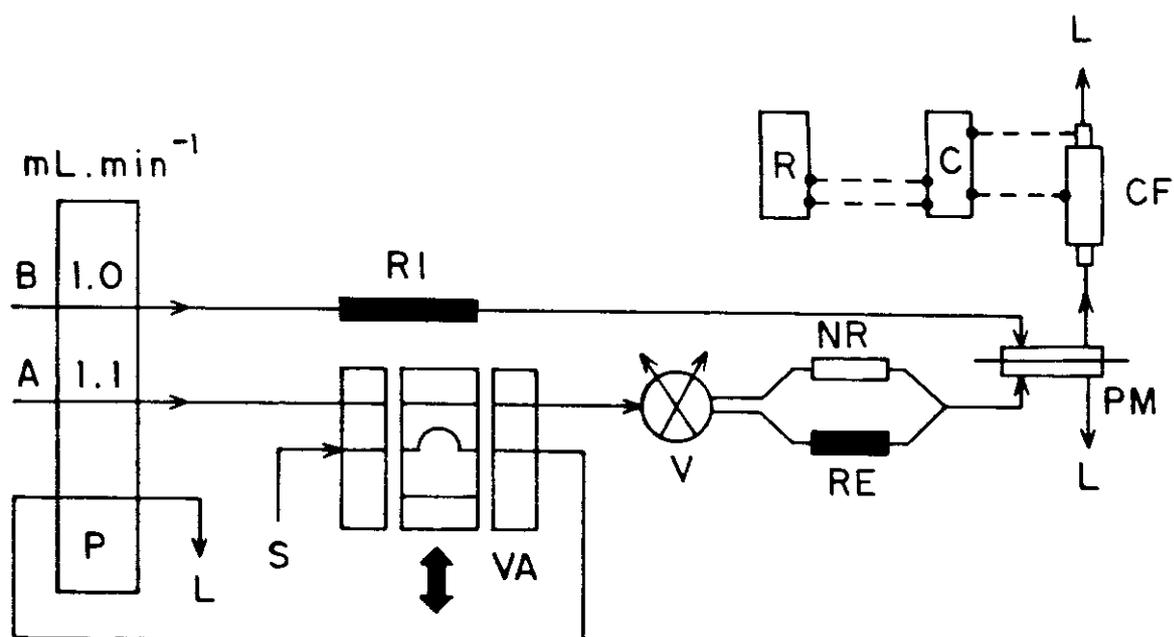


Figura II.8 - Sistema FIA condutométrico. A e B, fluxos de água desionizada; P, bomba peristáltica; S, alça de amostra; RE, reator enzimático; NR, reator não enzimático; RI, coluna de troca iônica; VA, válvula de amostragem; PM, célula de permeação; CF, célula condutométrica para fluxo; C, condutivímetro; R, registrador; V, válvula de seleção e L, lixo.

Para comparação das mesmas amostras, foi utilizado um reator não enzimático com características muito próximas ao reator com enzima, exceto que o mesmo foi preenchido com pedaços de isopor[®], para considerar à parte o principal interferente na urina, bicarbonato. Tal dispositivo foi utilizado apenas para análises das amostras de urina. Como sinal efetivo considerou-se a medida obtida no reator enzimático menos os sinais registrados no reator não enzimático e do branco que foi praticamente desprezível.

II.5.3 PROCEDIMENTO ANALÍTICO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Construíram-se dois reatores enzimáticos com as mesmas características do procedimento anterior, exceto para um deles, constituído da enzima oxalato oxidase e peroxidase. Em ambos, fluíram 100 μL de soluções de ácido oxálico padrão e de amostras de capim, preparadas nos respectivos meios de medida, que reagiram com as enzimas e produziram o dióxido de carbono. Este gás foi então submetido a um meio ácido ($\text{pH} \approx 1$) por confluência com ácido fosfórico 1 mol / L e após este evento, passou pela membrana de teflon[®] promovendo as mudanças de absorbância na via do indicador ácido-base (PBC). O esquema de fluxo utilizado encontra-se na Figura II.9.

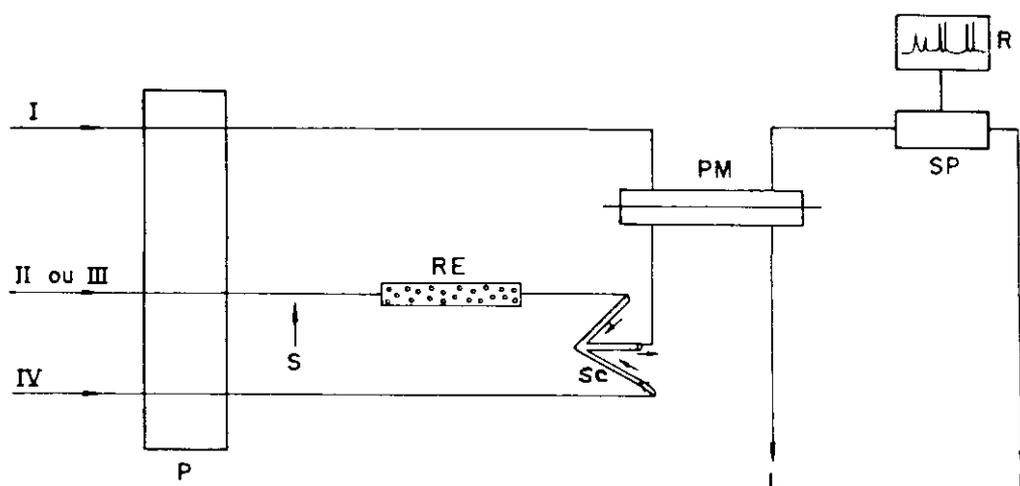


Figura II.9 - Sistema FIA com detecção espectrofotométrica. I, solução de púrpura de bromocresol; II, solução de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{H}_3\text{PO}_4$ 0,05 mol / L pH 3,00 (via usada apenas para o reator com oxalato oxidase); III, tampão ácido succínico- NaOH pH 4,00 contendo 1,0 mmol / L de NaH_2EDTA (via usada para o reator composto por oxalato oxidase e peroxidase proveniente do kit comercial); IV, ácido fosfórico 1,0 mol / L; P, bomba peristáltica; RE, reator enzimático; SC, sistema de confluência; PM, célula de permeação; SP, espectrofotômetro; S, amostra; R, registrador e L, lixo.

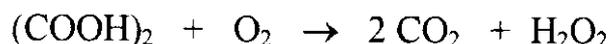
II.5.4 METODOLOGIA COMPARATIVA⁽¹²⁶⁾

Diluem-se todos os reagentes liofilizados nos meios indicados pelo procedimento Sigma 591 colocando-os à temperatura de 37°C. Pipetam-se em tubos de ensaio: o branco, padrão, urinas controle e amostras, sendo o reagente cromóforo adicionado em todos os tubos. Adiciona-se o reagente contendo as enzimas (oxalato oxidase e peroxidase) para um dos tubos e mistura-se por inversão. Deixa-se em incubação por cinco minutos e finalmente fazem-se as leituras de absorbância em 540 nm. Repete-se o mesmo procedimento para os outros tubos descontando-se os respectivos valores dos brancos.

II. 6 BIOSSENSOR BI-ENZIMÁTICO

Nas últimas décadas, materiais biológicos como enzimas, anticorpos, cofatores, células, organelas entre outros têm ganho especial interesse em química analítica por fornecerem principalmente maior seletividade, estabilidade e baixo custo por análise, quando adequadamente imobilizados e intimamente acoplados a transdutores⁽¹⁰¹⁾. Estas associações, baseadas em fenômenos bioquímicos, constituem a classe de sensores conhecidos por biossensores. Na reação catalisada pela enzima oxalato oxidase, o ácido

oxálico na presença de oxigênio é convertido em peróxido de hidrogênio e dióxido de carbono:



Empregando-se um eletrodo tipo Clarck, sensível a oxigênio, com as enzimas peroxidase e oxalato oxidase, pode-se determinar concentrações de ácido oxálico, medindo-se variações de pressões parciais de oxigênio.

II.6.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Cerca de 120,0 g de folhas de espinafre, comprados no mercado local, foram secas em estufa a 60°C sob ventilação, durante 48 horas e pulverizadas em moinho de facas. Pesaram-se cerca de 360 mg deste material, adicionaram-se tampão succinato, pH 4,00, até o volume de 10,0 mL. Em seguida o material foi introduzido num banho de água regulado em 50°C, onde permaneceu por 12 horas.

II.6.2 MONTAGEM E METODOLOGIA

Pesou-se 30,0 mg de cevada e 15,0 mg de tecido de raiz de Armoracia rusticana testando-se várias disposições na superfície do transdutor. Estes materiais bioativos foram acoplados fisicamente ao eletrodo com o auxílio de uma rede de Nylon® e um “O-ring”.

Após montagem, 2/3 do biossensor foi imerso na célula de medida termostaticada contendo 10,0 mL de tampão succinato-EDTA saturado com oxigênio. A saturação e agitação foi mantida durante o decorrer de todas as análises. Aguardou-se a estabilização das leituras em % de saturação de oxigênio e, imediatamente, adicionou-se pequeno volume de solução padrão de ácido oxálico mais concentrado. Sempre, executou-se as medidas no sentido crescente em relação às concentrações, fixando-se o tempo de reação em dois minutos, para a obtenção do valor da variação da pressão parcial de oxigênio consumido ($-\Delta$ % sat.O₂). O mesmo procedimento foi adotado para as determinações envolvendo as amostras de espinafre. As curvas analíticas, as análises de espinafre bem como o procedimento Sigma espectrofotométrico, foram realizadas no mesmo dia.

III - RESULTADOS E DISCUSSÕES

III.1 IMOBILIZAÇÕES

A estabilidade de materiais bioativos por longos períodos de tempo é a principal limitação dos produtos comerciais, especialmente tratando-se de enzimas. Geralmente quando imobilizadas, ficam menos vulneráveis às alterações estruturais, mantendo boa parte das características iniciais. Outro ponto a ser considerado é a especificidade da enzima em relação ao substrato, no caso do ácido oxálico, a enzima oxalato oxidase, mostra-se mais interessante para uso analítico. Além disso, requer etapas mais simples de purificação, e é encontrada em diversas espécies vegetais, portanto, está mais disponível. Estes foram os motivos que levaram à adoção de tal biocatalisador com o intuito de analisar ácido oxálico, em algumas amostras biológicas.

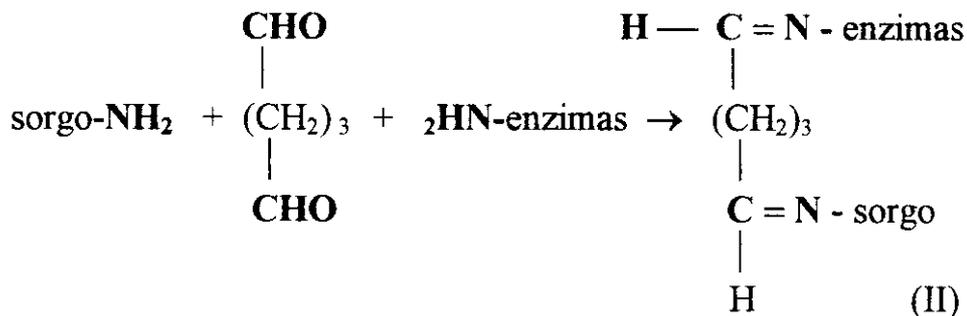
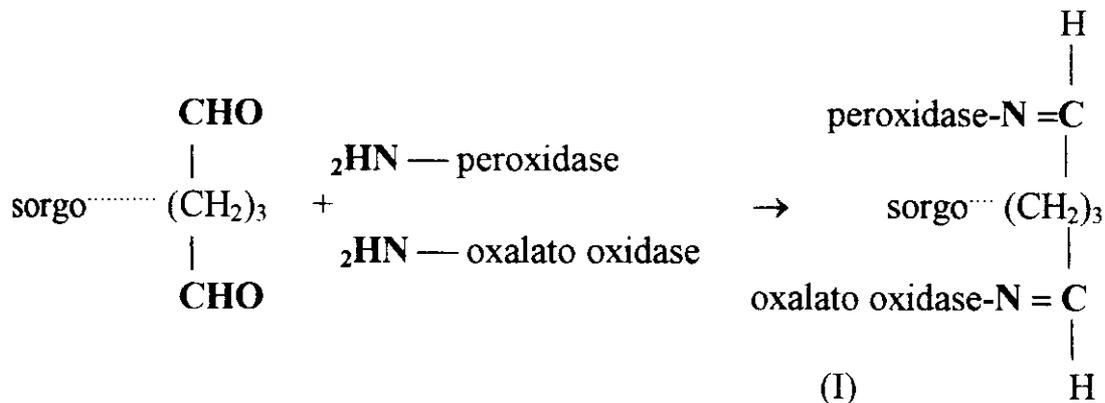
Para a maioria das proposições de caráter analítico, a quantidade de enzima que pode ser imobilizada, na verdade, requer uma pequena porcentagem para ser ativa e completamente funcional⁽¹²⁷⁾. Esta característica comum às enzimas, fornece uma aproximação bastante útil e de instinto prático na elaboração de biossensores e reatores enzimáticos. Nas imobilizações envolvendo matrizes inorgânicas, a saber: “bolas de vidro” e sílica gel funcionalizada com grupos NH_2 , ambas ativadas com glutaraldeído, os

resultados obtidos em sistemas de análise por injeção em fluxo mostraram alto grau de lixiviação, atividade muito baixa e surgimento de pressões excessivas nas linhas de fluxo. Comportamento semelhante foi observado nas imobilizações sobre quitina e álcool polivinílico (APV), nas medidas em fluxo e com eletrodo sensível a dióxido de carbono, respectivamente.

Algumas enzimas podem ser empregadas para fim analítico sem a necessidade de purificação^(95,96,128). Sementes de Sorghum vulgare, por exemplo, contêm a enzima oxalato oxidase⁽⁷³⁾ que nas condições experimentais de estudo, permitiu a detecção de sua atividade catalítica, utilizando-se um reator tipo “stirring bar” e eletrodo sensível a gás carbônico. Para observação desta atividade, houve necessidade de submeter o material biológico ao embebimento em uma solução de cloreto de potássio. Provavelmente, os fenômenos de transporte a nível de membrana celular em vegetais seja controlado por difusão e a presença dos íons hidratados promovam uma maior permeabilidade do substrato.

Pela utilização de reagentes bifuncionais, como o glutaraldeído em algum tipo de matriz seja natural ou artificial, pode-se promover a imobilização via ligação covalente cruzada. No caso específico das enzimas oxalato oxidase e

peroxidase, immobilizadas sobre sorgo ativado com glutaraldeído, o mecanismo pode ser representado por :



Numa primeira possibilidade, como mostrado na reação (I), podem ocorrer interações hidrofílicas entre as moléculas de glutaraldeído com os componentes do material biológico, caracterizando a ativação. Os grupos amino, comuns às enzimas, juntamente com os grupos aldeído do glutaraldeído,

unem-se através de ligações covalentes cruzadas, promovendo assim o processo de imobilização. Por outro lado, grupos amino das proteínas e polissacarídeos componentes do sorgo, também podem interagir com um dos grupos da molécula de glutaraldeído enquanto que a outra posição compromete-se com a imobilização da peroxidase ou oxalato oxidase como mostrado na reação (II). De maneira adicional, as interações entre as regiões hidrofílicas, hidrofóbicas e íons metálicos do material biológico com as enzimas, podem conferir maior estabilidade ao produto final. Como o próprio material natural já contém a enzima oxalato oxidase, embora com baixa atividade, este serve como matriz para suporte de quantidades adicionais de enzimas, permitindo que a mesma fique imobilizada. O procedimento, mostrou-se promissor para ser utilizado em metodologias em fluxo e biossensores, bem como com possibilidades de aplicações que envolvam outros sistemas enzimáticos.

O uso das técnicas de imobilização é motivado por problemas e soluções de ordem prática, onde são contemplados a reutilização do material, automatização, miniaturização e monitorização *in vivo*. Certamente que, ponderando-se as vantagens e desvantagens entre metodologias que utilizam

enzimas solubilizadas e imobilizadas, as últimas apresentam desempenho superior, principalmente àquelas inseridas em materiais brutos.

III.2 ELETRODO SENSÍVEL AO DIÓXIDO DE CARBONO

Considerando a reação de dióxido de carbono com uma solução de bicarbonato de sódio (solução interna de preenchimento do eletrodo Figura II.1), as equações de equilíbrio e o princípio da eletroneutralidade, as expressões a seguir são válidas para representar as pressões parciais deste gás⁽¹²⁹⁾.

$$k.P_{CO_2} = [H_2CO_3] = \{ (a_{H^+})^2 + a_{H^+} \cdot a_{Na^+} - K_w \} / K_1 \{ 1 + (2K_2 / a_{H^+}) \} \quad (1)$$

onde: k , é uma constante de proporcionalidade de $[H_2CO_3] / P_{CO_2}$; P_{CO_2} , pressão parcial do gás na solução; a_{H^+} e a_{Na^+} , atividades dos íons hidrônio e sódio, respectivamente; K_1 e K_2 , primeira e segunda constantes de dissociação do ácido carbônico e K_w , produto iônico da água. No caso em que não há íons Na^+ , a_{H^+} é igual a zero (ex. solução de preenchimento NH_4Cl), a equação (1) fica reduzida.

$$[H_2CO_3] = (a_{H^+})^2 / K_1 \quad (2)$$

O potencial expresso pela equação de Nernst para o íon hidroxônio pode ser escrito como a seguir e combinando as equações (2) e (3) obtem-se:

$$E = E^0 + 0,059 \log_{H^+} \text{ a } 25,0^0\text{C} \quad (3)$$

$$E = E^0 + 0,030 \log [H_2CO_3] + 0,5 \log K_1 \quad (4)$$

Desta maneira, um gráfico do potencial gerado versus o logaritmo da concentração do ácido carbônico, deve fornecer uma relação linear com um coeficiente angular de 30 mV/década de concentração a 25,0⁰C. Por outro lado, quando emprega-se como solução de preenchimento, bicarbonato de sódio diluída, os termos $a_{H^+}^2$ e K_w são negligenciáveis e a equação (1) fica: $[H_2CO_3] = a_{H^+} \cdot a_{Na^+} / K_1$ (5). Substituindo-se a equação (5) na (3) tem-se:

$$E = E^0 + 0,059 \log \{ [H_2CO_3] \cdot K_1 / a_{Na^+} \} = E^0 + 0,059 \log K_1 - 0,059 \log a_{Na^+} + 0,059 \log [H_2CO_3] \quad (6)$$

Esta última equação prediz uma relação linear entre as concentrações de ácido carbônico nas amostras e as diferenças de potencial apresentando um coeficiente angular de 59 mV/década de concentração a 25,0⁰C.

Por motivos de solubilidade deste gás em soluções aquosas (lei de Henry) e limitações de ordem instrumental, a faixa útil para medida de CO_2 vai de 5×10^{-2} a 10^{-4} mol / L aproximadamente. Outros fatores a serem considerados são a temperatura e a presença do gás nas soluções de preparação. Experimentalmente, fez-se controle da temperatura ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) e borbulhando-se oxigênio previamente. Usou-se um sistema parcialmente fechado, aproveitando experiência adquirida por alguns autores⁽¹³⁰⁾. Sem dúvida, que as condições utilizadas, conforme descritas neste trabalho, forneceram os melhores resultados quando comparados com outras tentativas feitas anteriormente. As medidas realizadas de maneira relativa, eliminaram o problema do gás contido nas soluções, inclusive naquelas onde utilizou-se ácido clorídrico diluído. Ponderando as considerações teóricas, experimentais e originalidade do trabalho escolheu-se a enzima oxalato oxidase, reator tipo “stirring bar” e eletrodo sensível a dióxido de carbono para análises de ácido oxálico.

Nas medidas feitas com o reator, empregando a enzima naturalmente imobilizada nas sementes de sorgo, avaliou-se inicialmente a influência da temperatura sobre a resposta do conjunto, mantendo-se constantes as outras variáveis como da enzima solubilizada. Os resultados obtidos encontram-se a seguir na Figura III.1

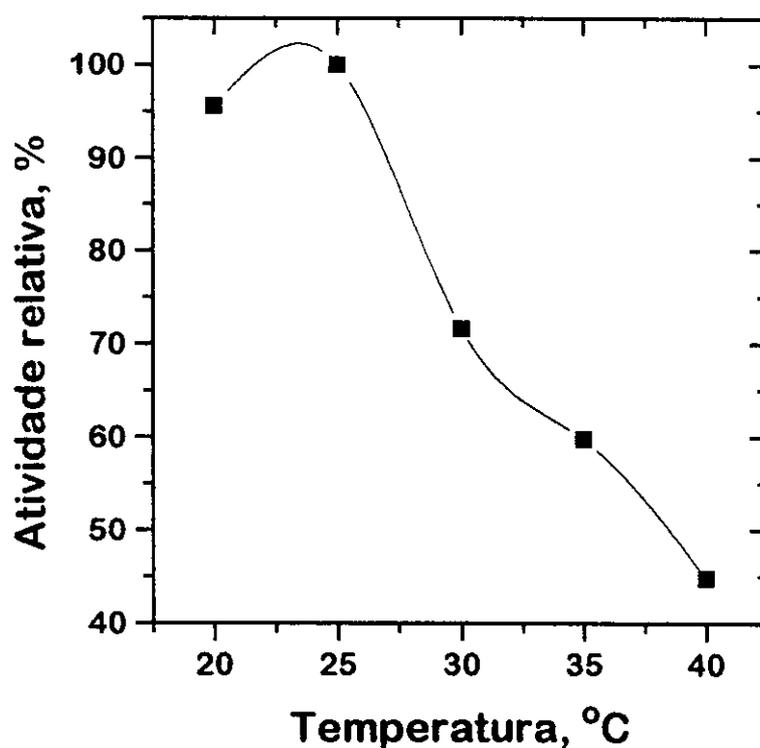


Figura III.1 - Influência da temperatura na atividade do reator enzimático tipo “stirring bar”; pH 3,8 (tampão succinato 0,05 mol / L).

Pode-se notar que entre 20,0 e 25,0 ($\pm 0,5$) °C, o conjunto apresentou maior atividade relativa e diminuiu a cerca de 70% da atividade inicial quando submetida à temperatura de 30°C. Portanto, esta enzima no seu microambiente natural e nas condições experimentais, apresenta significativa sensibilidade às variações de temperatura. Mantendo-se a temperatura fixa em $25,0 \pm 0,5$ °C,

observou-se o comportamento do eletrodo e enzima frente às variações de pH, e os resultados encontram-se na Figura III.2

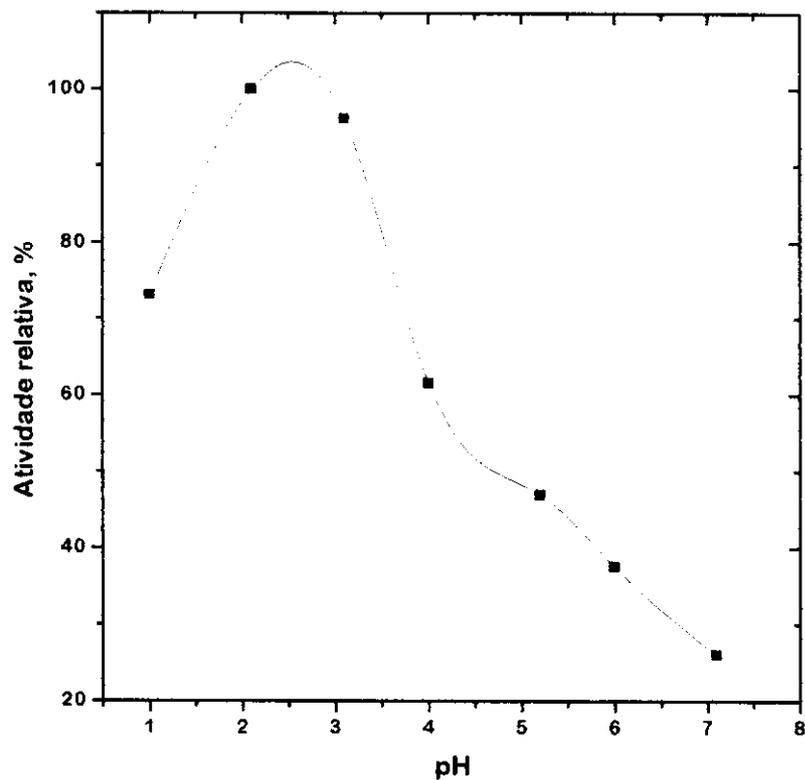


Figura III.2 - Influência do pH sobre a resposta do eletrodo sensível ao dióxido de carbono numa célula com a enzima oxalato oxidase naturalmente imobilizada em sorgo, $T = 25,0^{\circ}\text{C}$.

A enzima nesta condição de imobilização, apresentou uma faixa útil de trabalho num intervalo de pH entre 2,0 a 3,0. Abaixo de 2, pode-se atribuir o baixo sinal à inativação da enzima, enquanto que para valores superiores a 3, a diminuição do sinal deve-se à baixa disponibilidade do gás, inerente aos equilíbrios do ácido carbônico em água. Após o estabelecimento das condições ideais de funcionamento, obteve-se a curva analítica para o ácido oxálico e os resultados podem ser analisados na Figura III.3. Nota-se um intervalo linear de 1,0 a 4,0 mmol / L; uma faixa relativamente alta de concentrações; o que limita a aplicação desta metodologia para amostras reais. Todavia, pelos registros da literatura, não há trabalhos com esta enzima envolvendo eletrodo sensível ao CO₂ num arranjo deste tipo. Com esta constatação de ordem prática, optou-se então por um estudo cinético, que forneceu após o tratamento matemático dos dados da Figura III.3, segundo Lineweaver-Burk, a Figura III.4. Deste gráfico, pode-se obter o valor da constante de Michaelis-Menten aparente, cujo valor foi $K_M' = 1,5 \text{ mmol / L}$; quase cem vezes mais baixo em relação ao obtido na literatura recentemente para a enzima artificialmente imobilizada ($K_M' = 130 \text{ mmol/L}^{(132)}$), mesmo considerando as quantidades diferentes da enzima em cada caso.

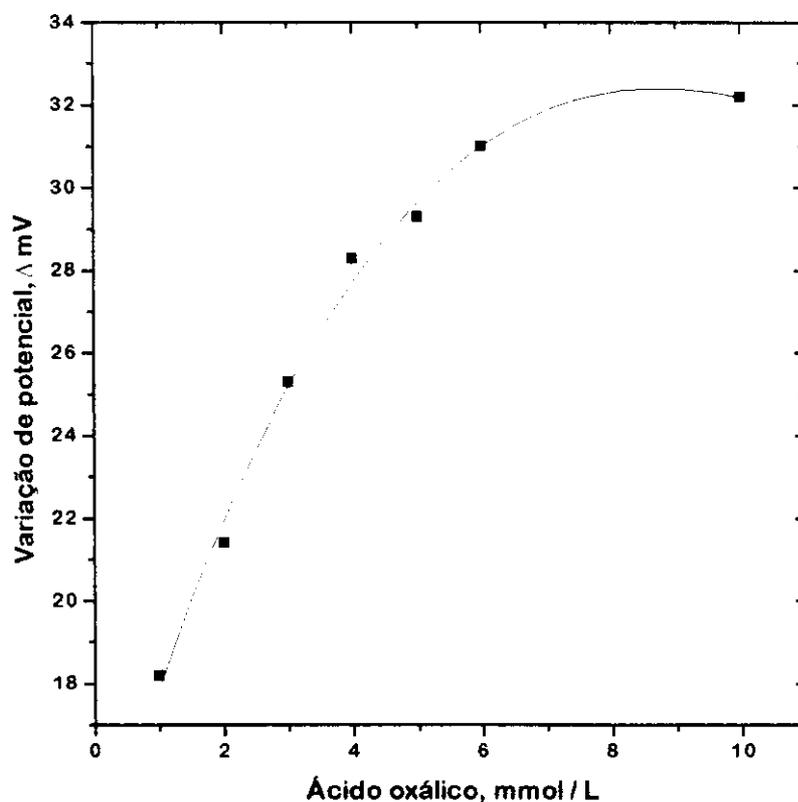


Figura III.3 - Curva analítica para o ácido oxálico. Condições experimentais (tampão glicina 0,05 mol / L e pH 2,5; T = 25,0 ° C e tempo de medida de 60s).

Este dado permite propor que, a enzima naturalmente imobilizada sobre o sorgo, tem maior afinidade pelo substrato. Deve ser considerado ainda, que a

enzima do trabalho anteriormente citado⁽¹³²⁾, foi inicialmente purificada e depois imobilizada.

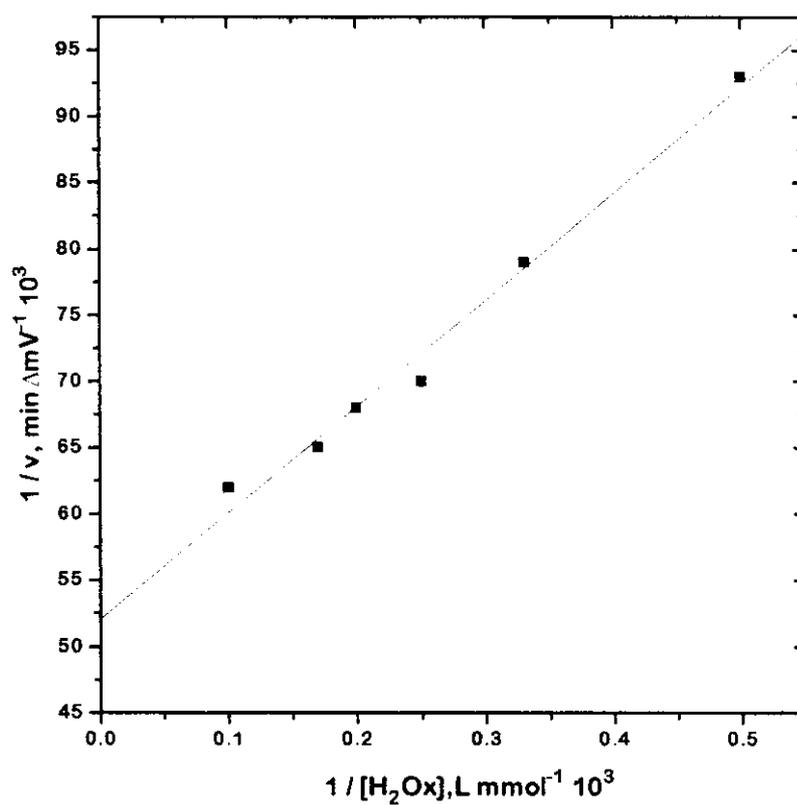


Figura III.4 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o experimento com a enzima oxalato oxidase naturalmente imobilizada sobre sorgo. Resultados obtidos da Figura III.3.

A perda de atividade das enzimas purificadas, é maior devido ao número de manipulações e variações das condições externas. Todas estas variáveis, contribuem de maneira significativa para a desestruturação terciária da proteína e conseqüentemente, de seus sítios ativos. Também é reconhecido que uma boa parte das enzimas não têm atividade suficiente nos meios naturais, para tornarem-se utilizáveis analiticamente, porém, o uso de ativadores adequados podem torná-las úteis no desenvolvimento de novas metodologias. A enzima oxalato oxidase proveniente de sorgo por exemplo, pode ser ativada por íons cobre(II)^(71,72), indicando provavelmente que os sítios ativos desta enzima apresentem grupos tióis(-SH). Esta constatação foi confirmada experimentalmente conforme mostra a Figura III.5.

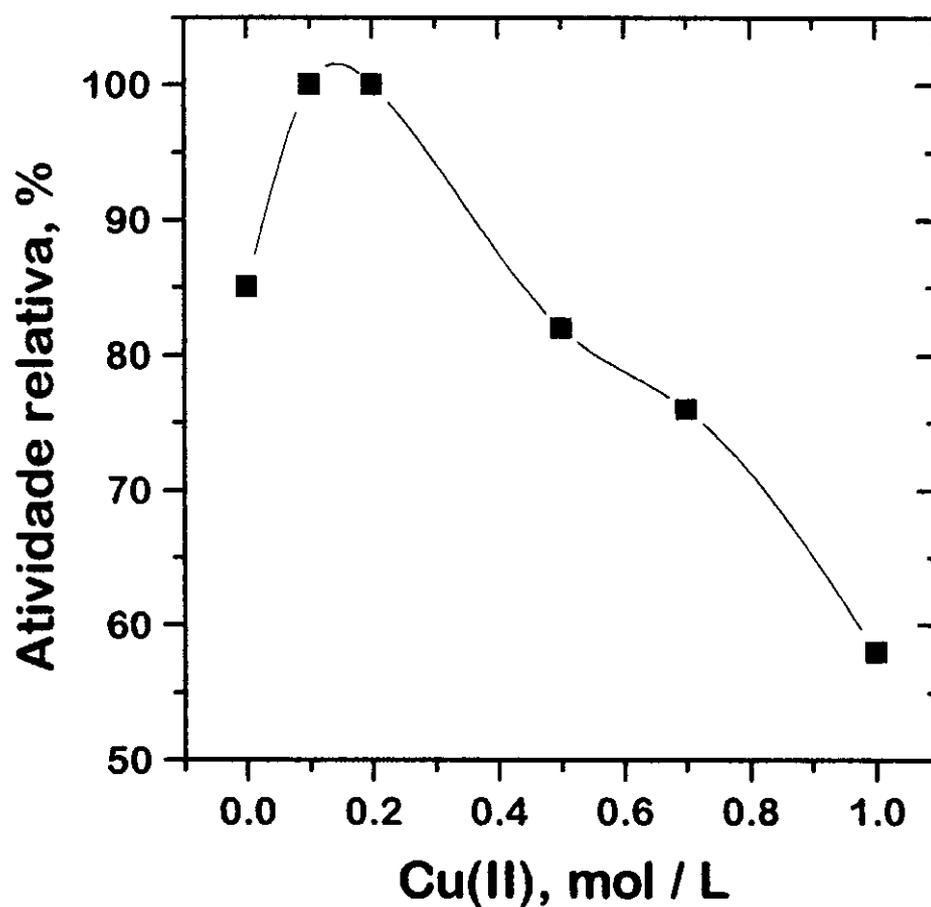


Figura III.5 - Efeito da concentração de íons Cu(II) sobre a atividade relativa da enzima oxalato oxidase naturalmnte immobilizada em sorgo.

Condições: pH 2,5; $[H_2Ox] = 2,0 \text{ mmol/L}$ e $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Dos trabalhos apresentados na literatura, nos quais utilizaram o eletrodo sensível para dióxido de carbono ^(89,96,97 e 133), todos envolvem biossensores,

sendo dois deles com a enzima oxalato descarboxilase. Isto evidencia a escassez de trabalhos nesta linha.

Após as explorações com a enzima proveniente de sorgo no reator tipo “stirring bar”, foram feitas muitas medidas em fluxo com dois tipos de configuração (Figura II.7). Os resultados obtidos indicaram a inviabilidade de uso do eletrodo sensível a CO_2 , com propósitos de automatização. Isto deveu-se provavelmente à incompatibilidade entre a velocidade de fluxo (necessária para uma razoável frequência de análise) e o tempo de resposta do eletrodo (cerca de 30 s).

III.3 MÉTODOS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)

As configurações de FIA são arranjos convenientemente montados e acoplados aos mais diversos equipamentos; como por exemplo; espectrofotômetros, colorímetros, fluorímetros, analisador de íons, cromatógrafos, condutivímetros, entre outros. Os componentes básicos dos sistemas FIA são : alça de amostra, volume de solução padrão ou amostra analisadas; via carregadora, caminho do fluxo onde a amostra é injetada; injetor/comutador, dispositivo manual ou automático que insere a alça de amostra na via carregadora e bobinas, que são prolongamentos da linha de fluxo para solucionar problemas de ordem cinética (normalmente usadas em

espectrofotometria). De maneira geral, todas estas componentes podem ser variados juntamente com as características do sistema químico a ser estudado, bem como da técnica escolhida. Tudo isto é feito visando, principalmente, alta frequência de análise, baixo consumo de reagentes, sensibilidade, repetibilidade e reprodutibilidade. Somando a estas possibilidades, inclui-se a viabilidade de realizar-se medidas fora do equilíbrio.

III.3.1 CONDUTOMETRIA

Não há trabalhos na literatura que descrevam metodologias para análise de ácido oxálico, em fluxo, baseadas na enzima oxalato oxidase e com detecção condutométrica. Baseando-se num novo modelo de célula para fluxo (Figura II.3)⁽¹²¹⁾ e com aquela enzima imobilizada sobre sorgo ativado com glutaraldeído, após exaustivas tentativas, conseguiu-se chegar a uma configuração que forneceu um melhor desempenho, como exibido na Figura II.8. Estas constatações foram obtidas em condições ideais idênticas àquelas já estabelecidas para a enzima na forma solúvel. Nestas mesmas condições os fluxos ideais também foram estudados e mantidos. Contudo, após diversos testes qualitativos, chegou-se a definir uma solução de NaH_2PO_4 0,05 mol / L em pH=3 ajustado com ácido fosfórico, comportamento que pode ser notado pela análise da Figura III.6. Estes resultados de maneira análoga podem ser

explicados da mesma forma como àqueles obtidos para o eletrodo sensível ao dióxido de carbono e com uma alça de amostra de 200 μ L. Neste caso não observou-se grande influência da temperatura sobre o sistema como um todo, portanto, adotou-se a temperatura ambiente; ou seja; 25,0 $^{\circ}$ C.

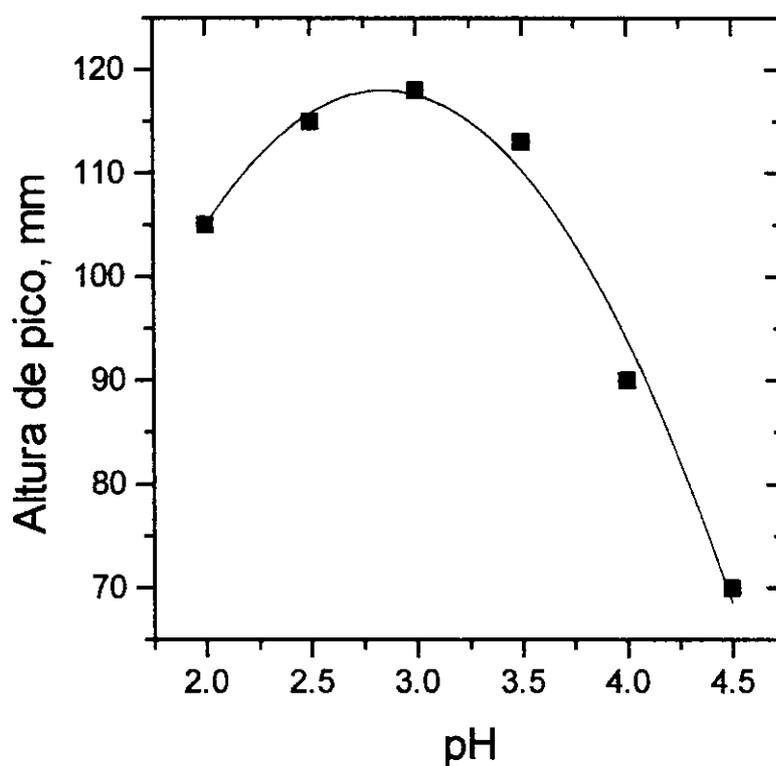


Figura III.6 - Influência do pH sobre a atividade da enzima oxalato oxidase de cevada imobilizada sobre sorgo ativado com glutaraldeído num sistema FIA com detecção condutométrica. [H₂Ox] 0,50 mmol / L, alça de amostra de 200 μ L e Temperatura de 25,0 \pm 0,5 $^{\circ}$ C.

Considerando o fenômeno da dispersão da zona de amostra, fez-se necessário um estudo das dimensões do reator enzimático a ser empregado. Para isso, fixou-se o comprimento do reator em 100mm variando-se o diâmetro interno. Estes resultados estão ilustrados na Figura III.7. O reator com 2 mm de diâmetro apresentou problemas de obstrução de fluxo, aparecimento de bolhas e linha de base irregular. Por isso, adotou-se o reator com as dimensões de 3mm por 100 mm de comprimento, mesmo porque os estudos envolvendo variação do comprimento do reator não mostraram ganho significativo no desempenho.

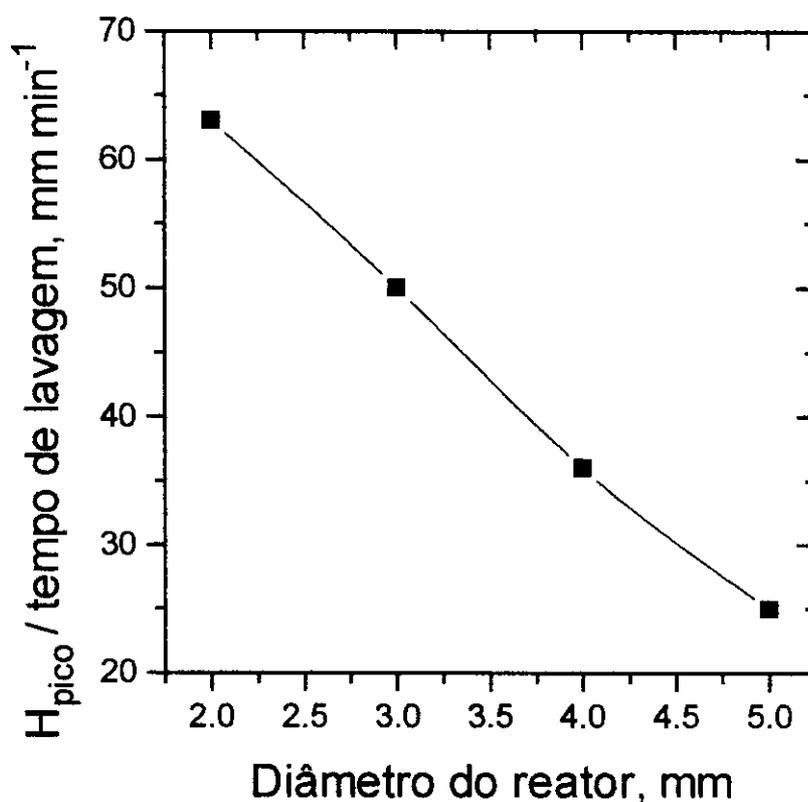


Figura III.7 - Relação entre resposta do sistema FIA e tempo de lavagem em função do diâmetro do reator enzimático. Condições: pH 3,0 (NaH_2PO_4 0,05 mol / L), comprimento do reator = 100mm, $[\text{H}_2\text{Ox}]^{\otimes} = 0,50$ mmol / L e $T = 25,0$ °C. [⊗]concentração de ácido oxálico.

Após a definição de todas as variáveis já citadas, obteve-se um fiograma para soluções padrões de ácido oxálico, cujo registro encontra-se na Figura III.8.

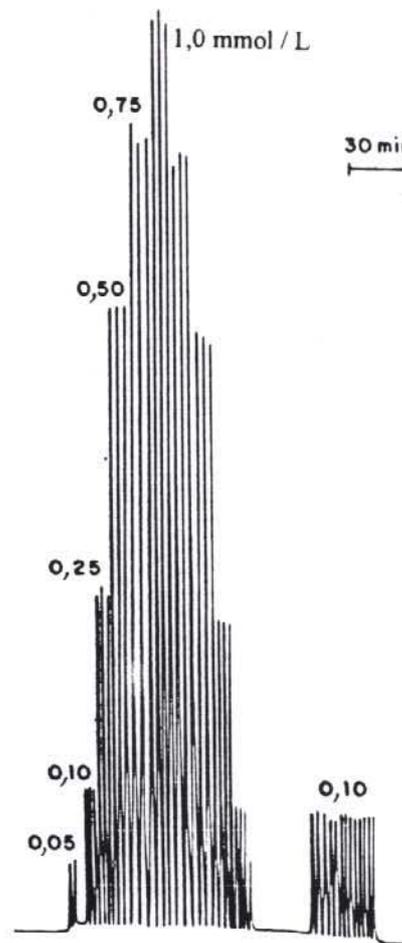


Figura III.8 - Varreduras em sistema FIA condutométrico para determinação de oxalato. Da esquerda para a direita: (0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 mmol / L e também na ordem inversa). Seguem diversas varreduras para uma solução 0,10 mmol / L. Condições: pH, 3,00 e temperatura 25,0^oC.

Levando-se em consideração todo intervalo, e após tratamento matemático, pode-se obter uma relação quadrática que vai de 0,05 a 1,0 mmol / L, útil para determinações de ácido oxálico em amostras padrões (Figura III.9).

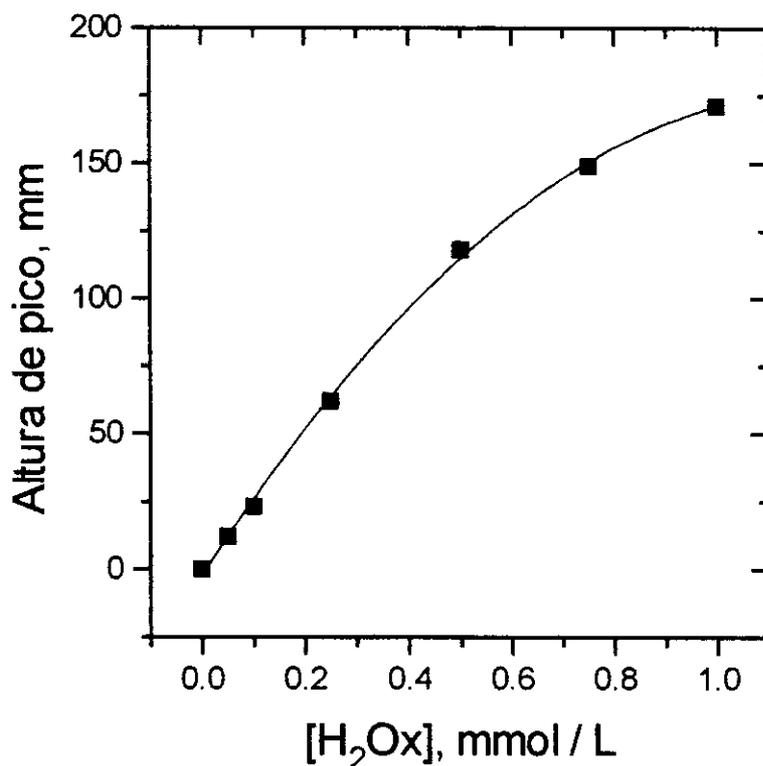


Figura III.9 - Curva analítica para soluções padrões de ácido oxálico em sistema FIA com detecção condutométrica. Condições: alça de amostra 200 μ L, pH 3,0 e T=25,0⁰C.

A faixa linear observada entre 0,05 e 0,50 mmol / L apresentou a relação matemática : $[Y = 1,1104 (s.d. 0,7681) + 229,387 (s.d. 3,013) X]$, $R = 0,9997$

(s.d. 1,2164) para N=5. A repetibilidade observada, expressa na forma de desvio padrão relativo, foi de 3,2 % para uma solução 0,10 mmol / L. Além disso, cerca de 20 determinações por hora foram possíveis com esta metodologia, mostrando assim a viabilidade em situações onde há elevada demanda de amostras.

Análises de ácido oxálico, ou qualquer outro analito, em espécimes de urina, normalmente são acompanhadas de problemas⁽¹³⁴⁾ relacionados à complexidade, reatividade química e alterações de composição diárias. Desta forma, a amostragem, conservação e armazenamento foram cuidadosamente considerados. Com estas peculiaridades inerentes às amostras de urinas e com os devidos cuidados tentou-se inicialmente analisar o ácido oxálico por FIA, de maneira direta. Obtiveram-se sinais muito superiores em relação àqueles da curva analítica (Figura III.9). De posse destes dados e da composição da urina, fizeram-se estudos dos possíveis interferentes, constatando-se que o maior interferente era o íon bicarbonato, presente em grande quantidade neste tipo de amostra. As tentativas visando eliminação deste interferente por aquecimento brando (60°C) e acidificação (pH ≈ 1), não forneceram bons resultados.

Optou-se então pelo uso do método da adição de padrão, notando-se que realmente amostras de urinas têm quantidades diferentes de metabólitos voláteis, podendo até evidenciar algum tipo de implicação clínica. Nestas medidas, as diluições foram ajustadas para atingir a faixa linear (0,05 a 0,50 mmol/L). Os resultados estão exibidos nas Figuras III.10 e III.11.

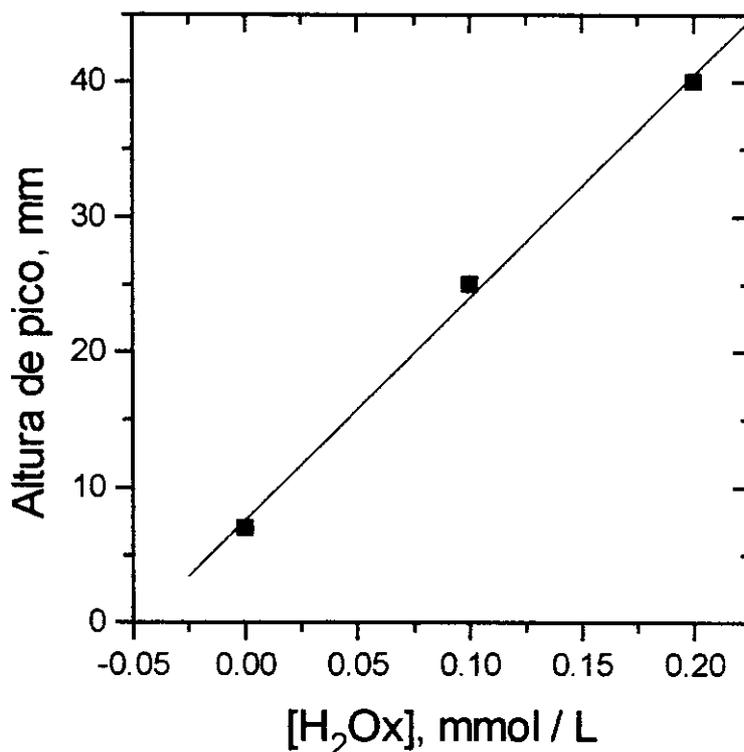


Figura III.10 - Gráfico da adição de padrão para amostra de urina liofilizada da Sigma (controle N). Dados obtidos pela subtração: sinal da amostra - (sinal do branco + sinal das impurezas voláteis).

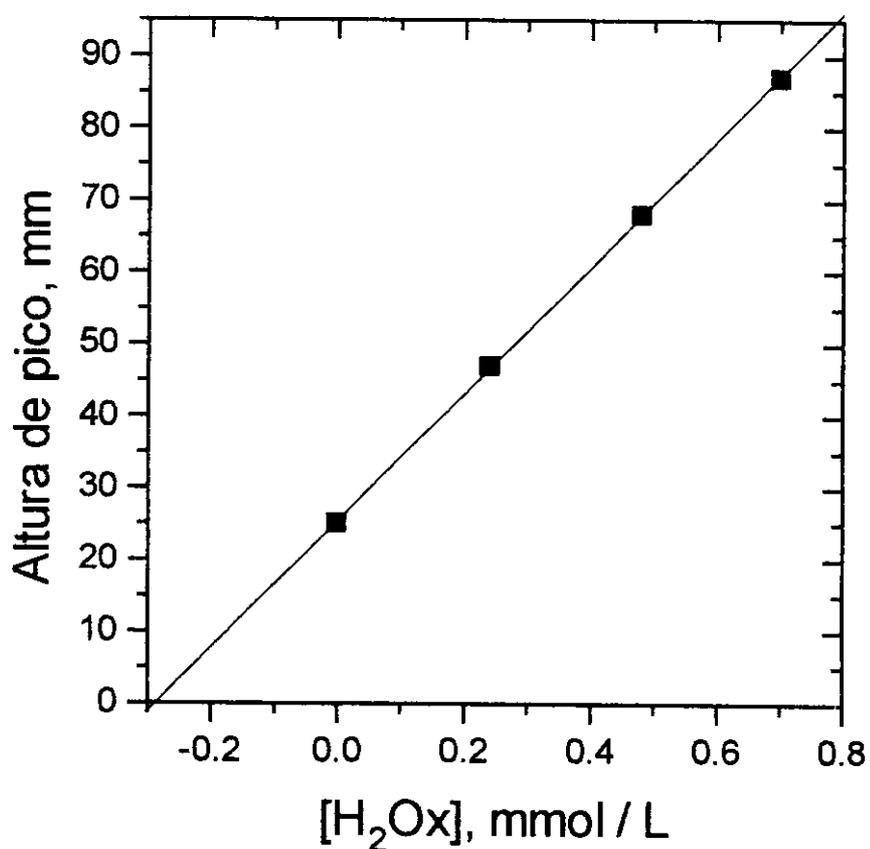


Figura III.11 - Gráfico da adição de padrão, para amostra de urina liofilizada da Sigma (controle E). Condições de cálculo idênticas às da amostra N.

Desta maneira e considerando os fatores de diluição, calcularam-se as concentrações do analito em cinco amostras de urina e os resultados

encontram-se na Tabela III.1, juntamente com os dados do método comparativo da Sigma.

Tabela III.1 - Correlação entre os dados obtidos pelos métodos proposto e da Sigma para cinco amostras de urina. Os valores estão expressos em mmol/L de ácido oxálico, em urinas excretadas em 24 horas, por pacientes adultos masculinos e o volume final das amostras foi de 1,48 L.

Metodos → Urinas ↓	Método espectrofotométrico	FIA condutométrico
N*	0.29±0.01	0.30±0.01
E**	1.31±0.02	1.30±0.04
1	0.30±0.01	0.28±0.01
2	0.16±0.01	0.18±0.01
3	1.34±0.02	1.31±0.04

*volume final de 25 mL e **volume final de 20 mL

Fazendo-se um tratamento matemático destes dados, obteve-se a relação linear : $Y = 0,00609$ (s.d. 0,01617) + $0,97928 X$ (s.d. 0,01877), $R = 0,9995$ (s.d. 0,0222) para $N=5$. Este resultado permite propor a aplicabilidade desta

metodologia para amostras de urina sem pré-tratamento, exigência comum em outros métodos⁽¹¹³⁻¹¹⁹⁾. Além disso, nenhum dos trabalhos já publicados tratam com a enzima imobilizada sobre um material natural (sorgo). Além disso, usam técnicas de detecção e arranjos de sistemas FIA mais complexos.

Os reatores foram estáveis por seis meses; utilizando-os semanalmente, para vinte análises em média, com retenção de 70% da atividade inicial, ao final do período.

III.3.2 ESPECTROFOTOMETRIA

A grande maioria dos métodos desenvolvidos em FIA utilizam a espectrofotometria, isto explica-se pelas limitações de ordem cinética, comum para a maioria das reações coloridas e pelo fato do sistema de detecção, estar localizado fora do sistema de fluxo. Assim, problemas de linha de base ficam bem mais amenizados, quando comparados com os sistemas eletroquímicos. Atualmente, há uma tendência no sentido do uso de fibras ópticas com espécies sensíveis incorporadas que são inseridas dentro do sistema de fluxo, inclusive com possibilidade de monitorização *in vivo*. Provavelmente, com estes dispositivos o alcance analítico pode ser maior, porém, com maiores dificuldades em relação às interferências de ordem química e instrumental.

Das configurações testadas, a ilustrada na Figura II.9, exibiu os melhores resultados. Nestas investigações, utilizaram-se dois tipos diferentes de material para a construção dos reatores. Nas primeiras investigações, construiu-se um reator com sementes de cevada ativada com glutaraldeído e com quantidades adicionais de enzima purificada. Obtiveram-se bons resultados por dois dias, após o que, o material transformou-se numa pasta, ocasionando entupimento da via carregadora. O segundo reator usado continha as enzimas oxalato oxidase e peroxidase, disponíveis no kit da Sigma. Inicialmente, avaliou-se as condições de fluxo, alça de amostra e relação comprimento/diâmetro do reator, obtendo-se os resultados listados na Tabela III.2. Trabalhando-se com estes dados, chegou-se às condições: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, $100\mu\text{L}$ e reator de $100\text{mm} \times 3\text{mm}$. Também foram estudadas as influências da concentração de púrpura de bromocresol (PBC) e do pH, cujos resultados são apresentados nas Figuras III.12 e III.13, respectivamente.

Tabela III.2 - Parâmetros operacionais do sistema FIA : pH 4,00 (tampão ácido succínico-NaOH 0,05 mol / L; contendo 1,0 mmol / L de Na₂H₂edta); T = 25,0 ± 0,5 ° C e sinais obtidos para soluções 0,50 mmol / L em ácido oxálico preparados no mesmo tampão.

PARÂMETRO	PERFORMANCE
fluxo, mL min ⁻¹	sinal [#] / tempo ^{##}
0,50	2,6
0,70	3,1
1,0	3,3
1,3	3,0
1,5	1,7
alça de amostra, µL	sinal / tempo
10	1,5
25	2,6
50	2,8
100	4,7
200	4,2
relação L / i.d. 10 ¹	sinal / tempo
5,0(100)	10
3,3(100)	7,5
2,5(50)	8,0
1,7(50)	6,7
10(200)	6,3
6,7(200)	6,0

[#]Alturas de pico em milímetros, ^{##} Tempos de lavagem, em minutos, necessários para atingir a linha de base, L / i.d. relação entre o comprimento e o Ø interno do reator enzimático. Entre parentesis, os valores em milímetros dos comprimentos dos reatores.

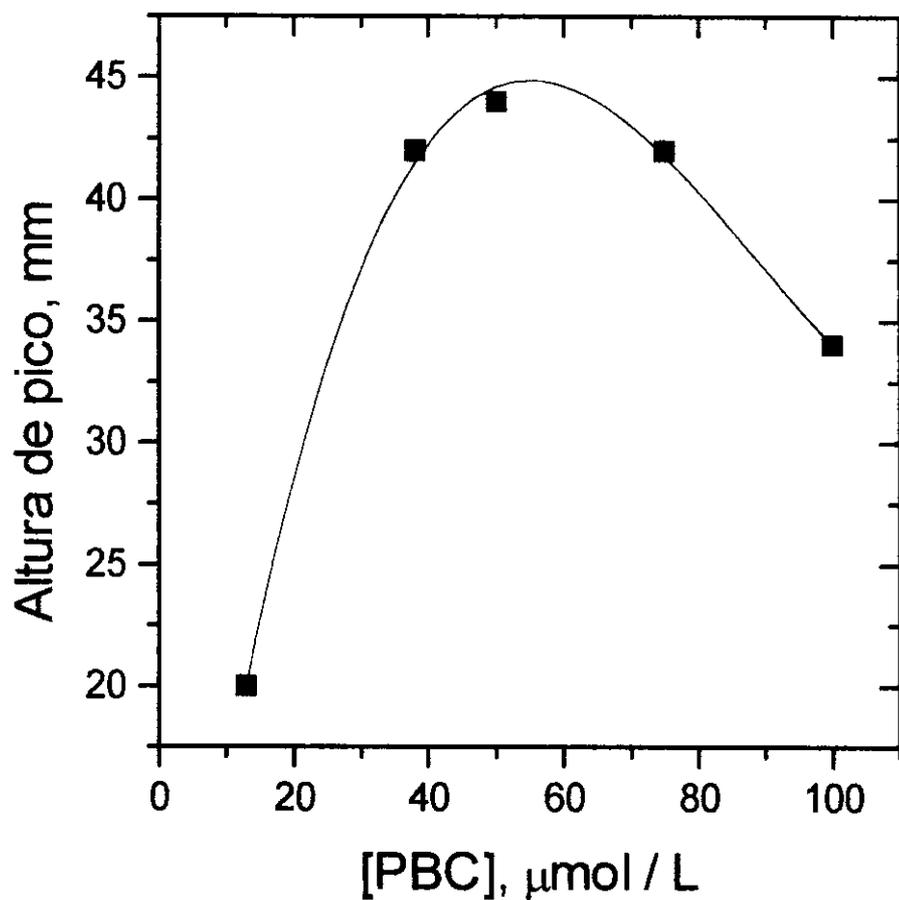


Figura III.12 - Resposta do conjunto FIA frente às variações de concentração do indicador púrpura de bromocresol(PBC). Condições: pH na via carregadora 3,0; alça de amostra $100\mu\text{L}$; $[\text{H}_2\text{Ox}]$ $0,25\text{ mmol/L}$ e reator de $100\text{mm} \times 3\text{mm}$.

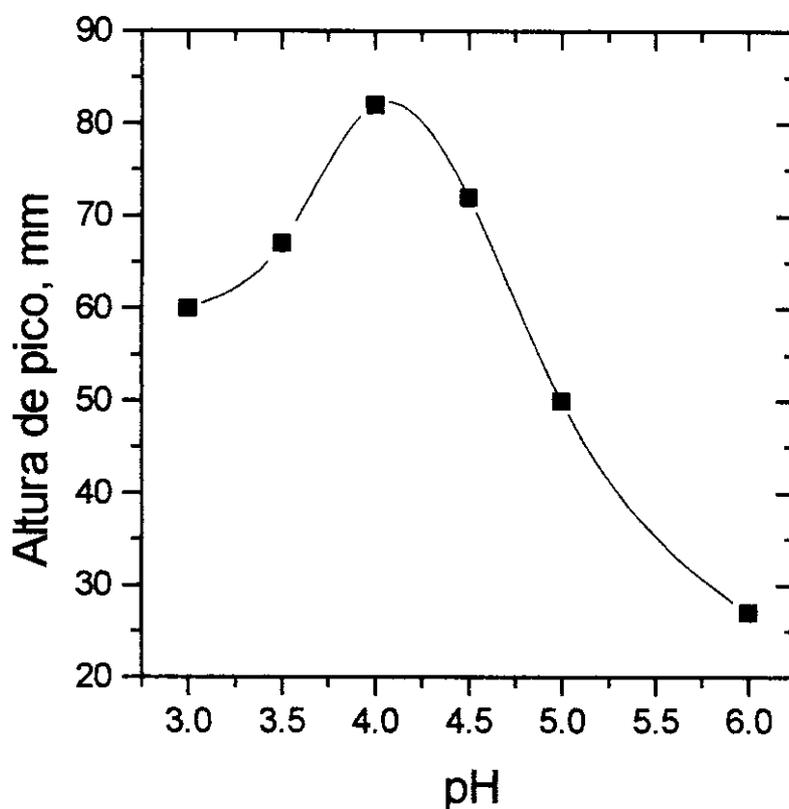


Figura III.13 - Efeito do pH sobre a resposta analítica do sistema FIA espectrofotométrico. Condições: $[H_2Ox]$ $0,50 \text{ mmol / L}$; $[PBC]$ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol / L}$; alça de amostra $100 \mu\text{L}$; fluxo da via carregadora $1,0 \text{ ml min}^{-1}$; reator enzimático $100\text{mm} \times 3\text{mm}$, soluções tampão (pHs 3,0 a 5,0) succinato-NaOH $0,05 \text{ mol / L}$ contendo $1,0 \text{ mmol / L}$ de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ e pH 6 ajustado com tampão fosfato também com o agente quelante.

Após o estabelecimento das condições ideais de funcionamento da metodologia, fez-se uma curva analítica no intervalo de concentração de 0,05 a 5,0 mmol / L. Os resultados destas varreduras, ascendente e descendente, encontram-se na Figura III.14. Com estes dados construiu-se a Figura III.15

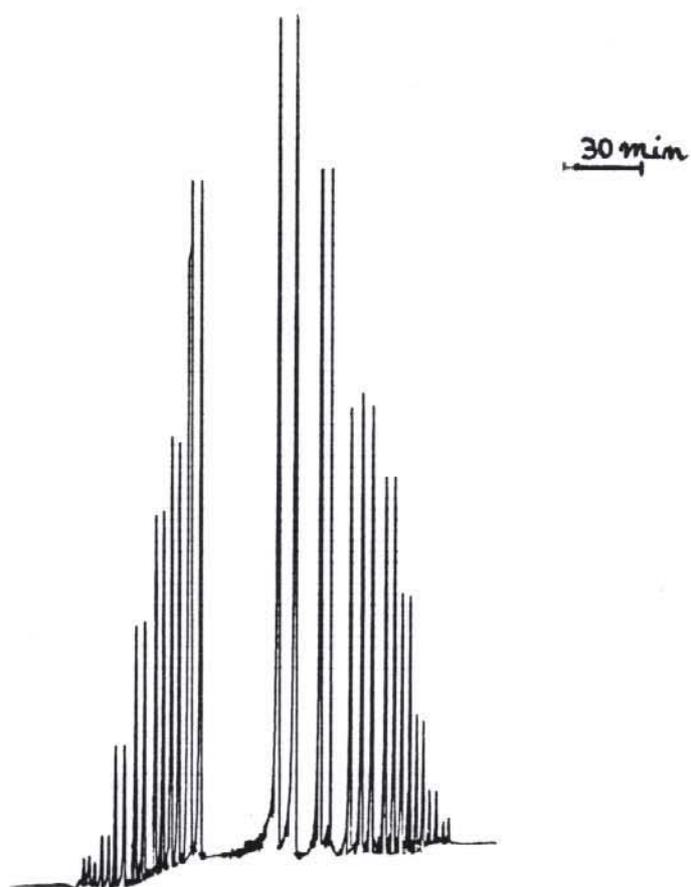


Figura III.14 - Varreduras em sistema FIA espectrofotométrico para soluções padrões de ácido oxálico. Da direita para a esquerda: 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,5 e 5,0 mmol/L. Na sequência, varreduras inversas.

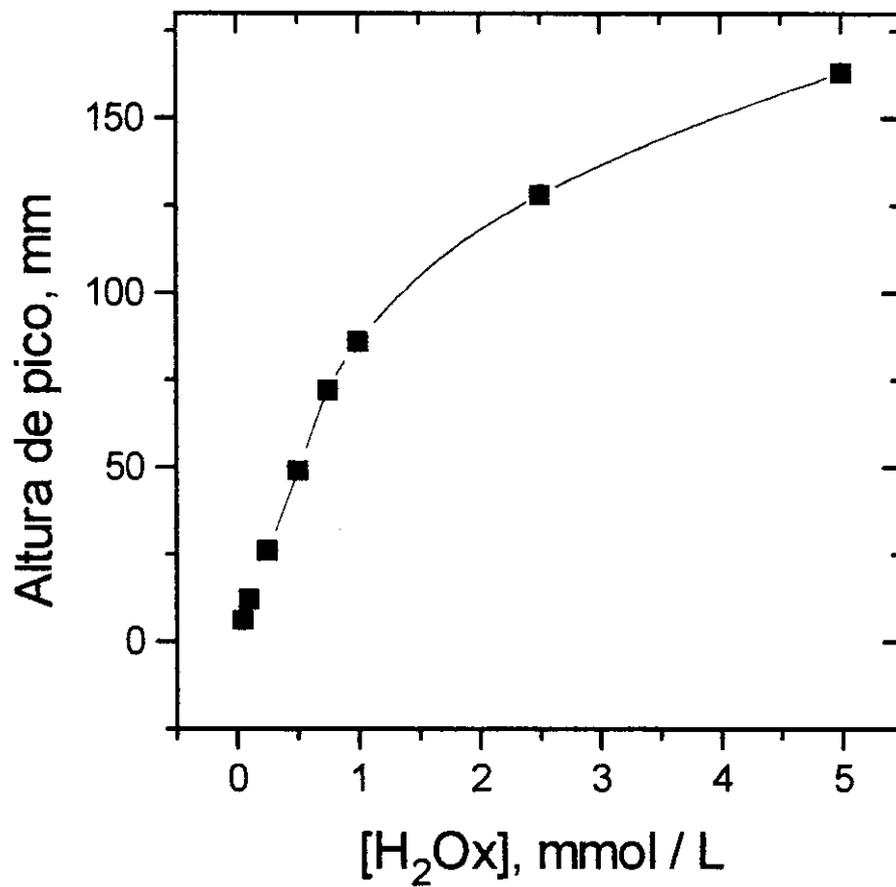


Figura III.15 - Curva analítica para o sistema FIA espectrofotométrico.

Condições: pH da via carregadora, 4,0; alça de amostra, 100 μ L; [PBC], 5,0x10⁻⁵ mol / L; temperatura, 25⁰C e reator enzimático de 100mm por 3mm.

A enzima imobilizada no reator enzimático apresentou atividade no intervalo estudado para fins analíticos, mostrando uma faixa útil de 0,05 a 1,0 mmol / L, com uma relação matemática expressa por : $Y = 1,427$ (s.d. 0,6075) + 94,81 (s.d. 1,580) X, $R=0,9995$ (s.d. 1,040) para $N=6$. Neste intervalo, pode-se determinar diretamente ácido oxálico em amostras reais, provavelmente sem o inconveniente da interferência de ácido L-ascórbico, comum a praticamente todas as metodologias já desenvolvidas. Isto pode ser explicado pelo fato da espécie relacionada com o sinal analítico (PBC) estar isolada fisicamente por uma membrana de PTFE, seletivamente permeável ao dióxido de carbono. Esta vantagem não aparece no método comercial (Sigma), cujo manual de instruções preconiza a solubilização de todos componentes da reação; a saber; enzimas, urina e cromóforo. A espécie oxidada deste último, é responsável pelo aumento de absorbância, que por sua vez é diretamente proporcional à concentração de ácido oxálico; portanto, a presença de redutor biológico, traria resultados mais baixos.

Para aplicação em problemas reais, realizaram-se análises de ácido oxálico em amostras de capins para pastagem. Determinações deste tipo, apesar de serem pouco comuns para os químicos, são de extrema validade para

zootecnistas e médicos veterinários. A metodologia foi aplicada para sete amostras de capins e os resultados podem ser analisados na Figura III.16.

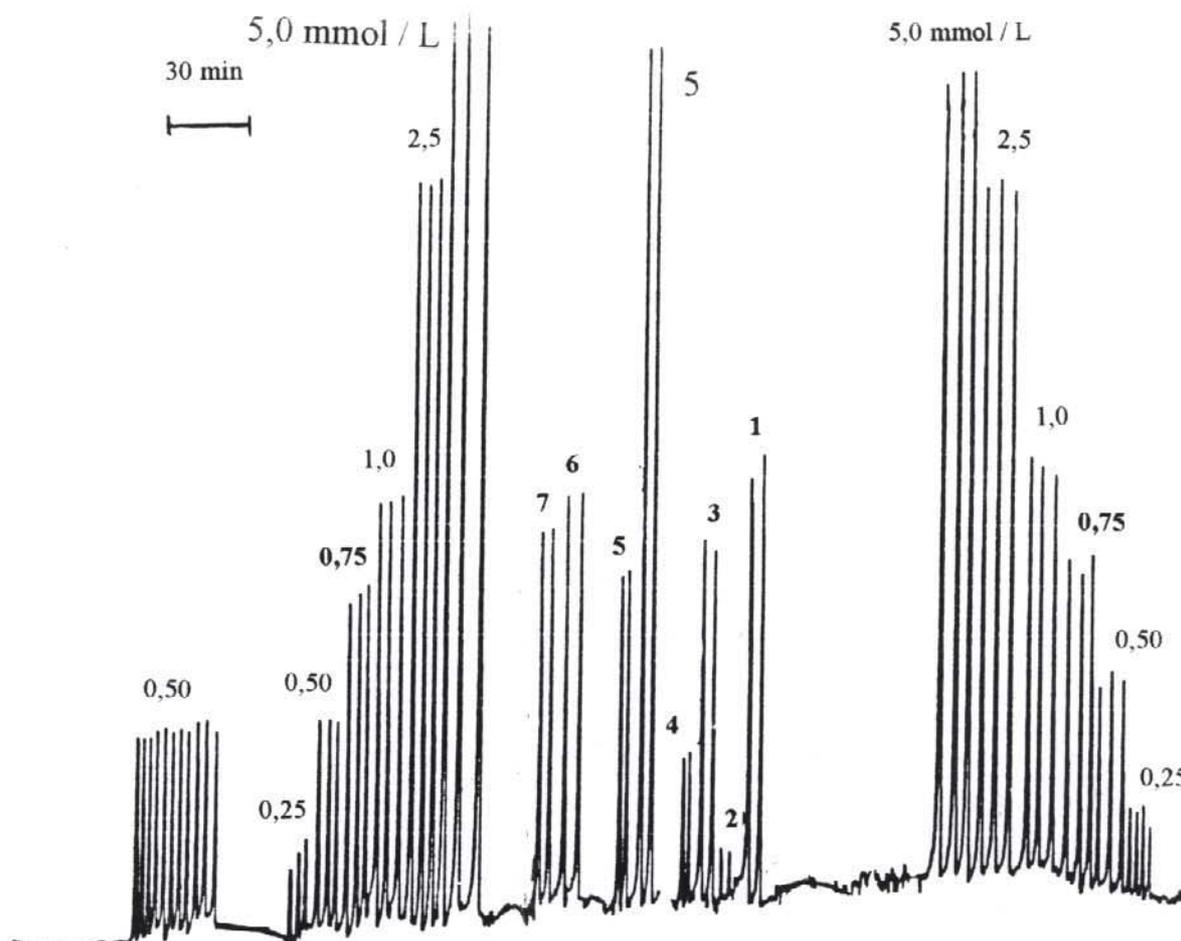


Figura III.16 - No sentido da varredura (direira para a esquerda): Diagramas crescente de soluções padrões do analito, amostras de capins e varredura decrescente. Alça de amostra $100\mu\text{L}$, reator enzimático de $100\times 2\text{mm}$ de \varnothing interno, pH 4,0 (succinato) e temperatura 25°C . Repetibilidade para uma solução $0,50\text{ mmol / L}$ (R. S. D. $\approx 4\%$).

Adicionalmente, empregou-se o método da Sigma para comparação, obtendo-se também uma boa correlação. A Tabela III.3 mostra os resultados encontrados.

Tabela III.3 - Quantidades de ácido oxálico solúvel contidas em amostras de capins para pastagem analisadas, pelo métodos proposto e pelo kit Sigma®. m_a = massa seca analisada. As amostras 3, 5 e 6 foram diluídas de 2, 4 e 5 vezes, respectivamente.

<u>AMOSTRA</u>	<u>CAPIM</u>	<u>m_a^*(mg)</u>	<u>FIA**</u>	<u>KIT**</u>
1	Quicuiu	210	595±24	624±31
2	Tifton-85	233	56±2	56±3
3	Tangola	275	596±24	589±29
4	<u>Brachiaria decumb.</u>	257	132±5	130±7
5	<u>Setaria splendida</u>	217	1456±58	1430±72
6	<u>Setaria anseps</u>	204	1912±76	1914±96
7	Tanner glass	216	394±16	380±19

*capim seco num volume final de 10,0 mL.

**Valores expressos em mg de ácido oxálico anidro por 100g de material.

Os argumentos utilizados para comparar o método FIA com detecção condutométrica com os apresentados na literatura, também são válidos para esta metodologia, com algumas colocações importantes. Há apenas um trabalho publicado⁽¹³⁵⁾ onde se usa membrana de PTFE para permear seletivamente o dióxido de carbono proveniente da reação, catalisada pela enzima oxalato descarboxilase. Este é convertido cataliticamente em metano, em condição muito drástica e cara. Recentemente⁽¹³⁶⁾, foi publicado trabalho sugerindo a possibilidade de melhorar a metodologia apresentada, com uso de um solvente não aquoso, como meio para corantes sensíveis a dióxido de carbono.

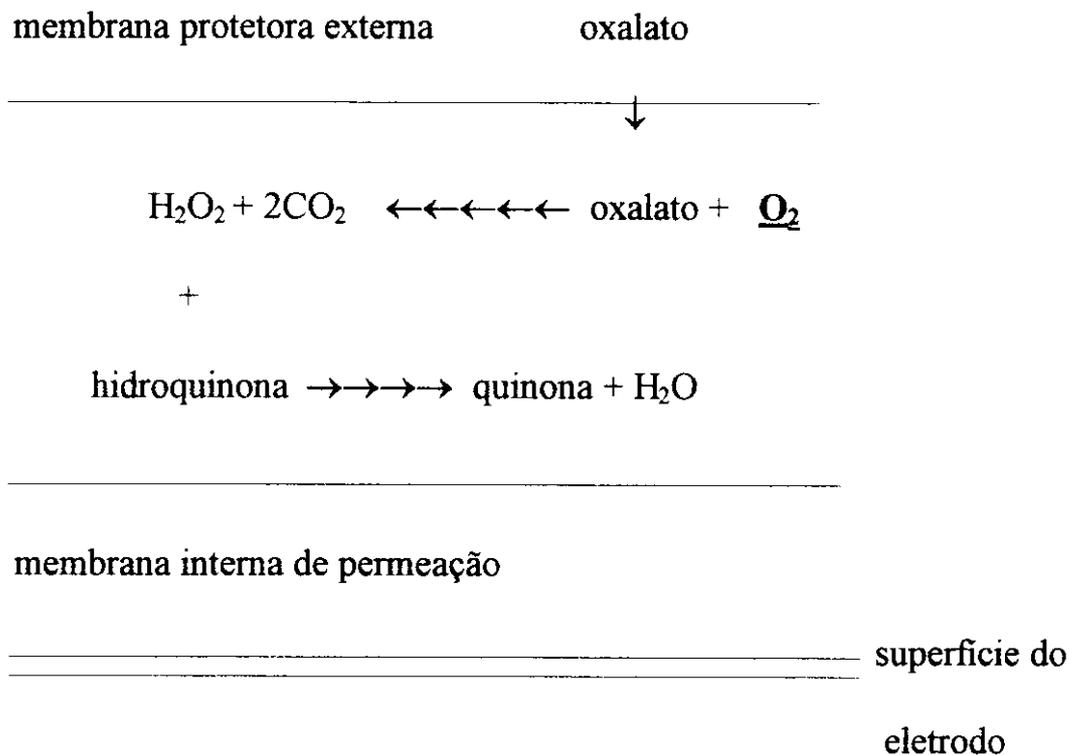
III.4 BIOSSENSOR BI-ENZIMÁTICO

Uma descrição das partes existentes nos biossensores, cujo transdutor é o eletrodo sensível ao oxigênio, está representada no esquema a seguir:

eletrodo		membrana seletiva		membrana com		meio a ser
		para O₂		enzimas		analisado

O tratamento matemático representativo destes compartimentos, considera: o número de camadas na bio-membrana com diferentes propriedades de difusão, o número de enzimas imobilizadas na bio-membrana, o número de substratos

da reação enzimática e as dimensões do modelo⁽¹³⁷⁾. Portanto, o sensor proposto, enquadra-se num modelo com duas enzimas e dois substratos, como mostrado a seguir.



Numa primeira etapa a enzima oxalato oxidase em presença de oxigênio, catalisa a reação de ácido oxálico, convertendo-o em peróxido de hidrogênio e dióxido de carbono. O peróxido, por sua vez, é consumido pela ação catalítica da peroxidase, transformado-se em água. Esta transformação é possível pela presença de hidroquinona, espécie comum aos tecidos vegetais, como por

exemplo, rábano (fonte de peroxidase). Este foi o mecanismo provável estabelecido para o biossensor baseado no eletrodo sensível ao O_2 e as enzimas citadas, que funcionaram como transdutor e elementos biológicos ativos, respectivamente.

No estudo das condições ideais de funcionamento do biossensor, investigou-se o efeito da temperatura sobre a resposta do conjunto, mantendo as outras variáveis constantes. A resposta analítica foi expressa em variações de pressões parciais de oxigênio na forma de % de saturação ($-\Delta$ % sat. O_2) num tempo de reação fixado em 2 minutos, suficiente para obtenção de sinal adequado. Estes resultados encontram-se na Figura III.17.

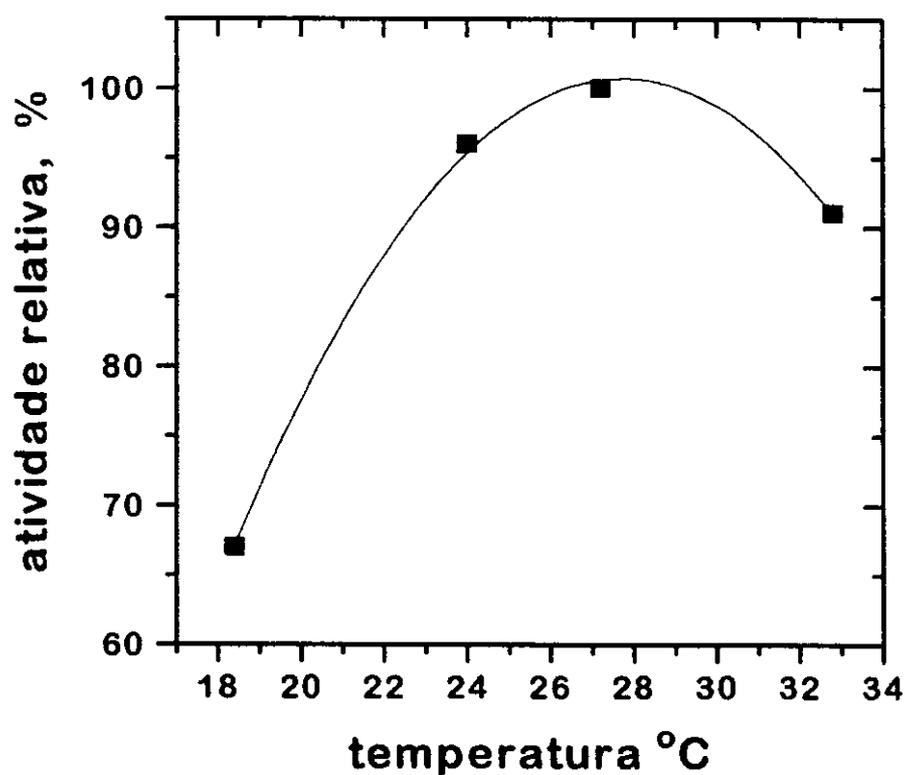


Figura III.17 - Influência da temperatura sobre a resposta do biossensor composto por oxalato oxidase imobilizada sobre cevada e peroxidase “in natura” proveniente de rábano. Condições: pH 4,0; $[H_2Ox]^{\otimes}$ 0,48 mmol / L, tempo de medida 2 min. e Volume final da Célula (Figura II.5) 5,0 mL. \otimes Concentração de oxalato.

Pode-se observar pouca variação deste parâmetro, no intervalo de 24,0 a 32,0 \pm 0,5°C; provavelmente, devido ao microambiente mais favorável em que as

enzimas estão alojadas. Escolheu-se o valor de $27,0^{\circ}\text{C}$ para todos estudos posteriores. De maneira semelhante, avaliou-se a variabilidade de resposta em função do pH. Como mostra a Figura III.18, em pH 4,0 obteve-se a melhor atividade.

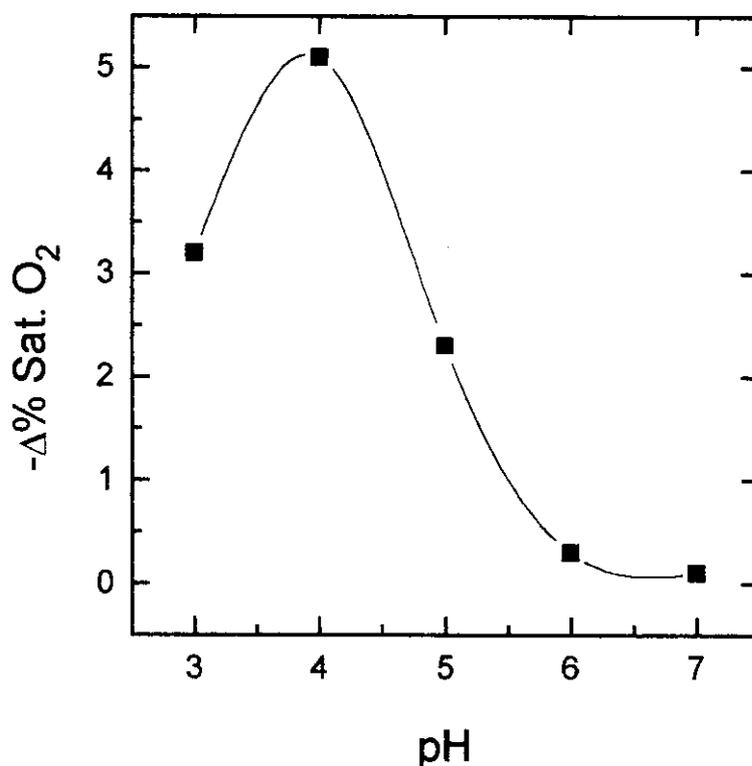


Figura III.18 - Efeito do pH sobre a resposta do biossensor bi-enzimático.

Condições: temperatura, $27,0^{\circ}\text{C}$; $[\text{H}_2\text{Ox}]$ $0,48 \text{ mmol / L}$; tempo de reação 2 min e tampões; de 3,0 a 5,0 (succinato-NaOH $0,05 \text{ mol / L}$ contendo 1 mmol / L de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$); 6,0 e 7,0 (tampão fosfato).

Neste caso, as baixas respostas encontradas nas condições extremas em relação ao pH ótimo, devem-se provavelmente, às mudanças estruturais ocorridas com a enzima oxalato oxidase, presente em quantidade muito menor, quando comparada com a peroxidase. Além disso, esta última encontra-se naturalmente imobilizada. Note-se que em pH 3,0; a atividade do sistema corresponde aproximadamente à metade do valor máximo. Isto deve-se ao fato das condições ótimas para atividade da segunda enzima, ocorrer entre pHs 6,0 e 7,0. Assim, adotou-se o valor 4,0, quando do uso destas duas enzimas, valor este(3,0) diferente daquele quando se emprega a enzima oxalato oxidase imobilizada sobre sorgo, no caso das medidas em fluxo, com detecção condutométrica.

Uma grande vantagem deste biossensor, é a ausência da enzima polifenoloxidase, abundante em tecidos vegetais, que provocaria sérias interferências.

Depois de estabelecidas as condições ótimas de pH e temperatura, verificou-se que a disposição das enzimas na superfície do eletrodo, também tinha relação com o sinal analítico ($-\Delta$ % sat. O_2). A disposição mais sensível às melhores variações de pressões parciais de oxigênio está ilustrada na Figura III.19.

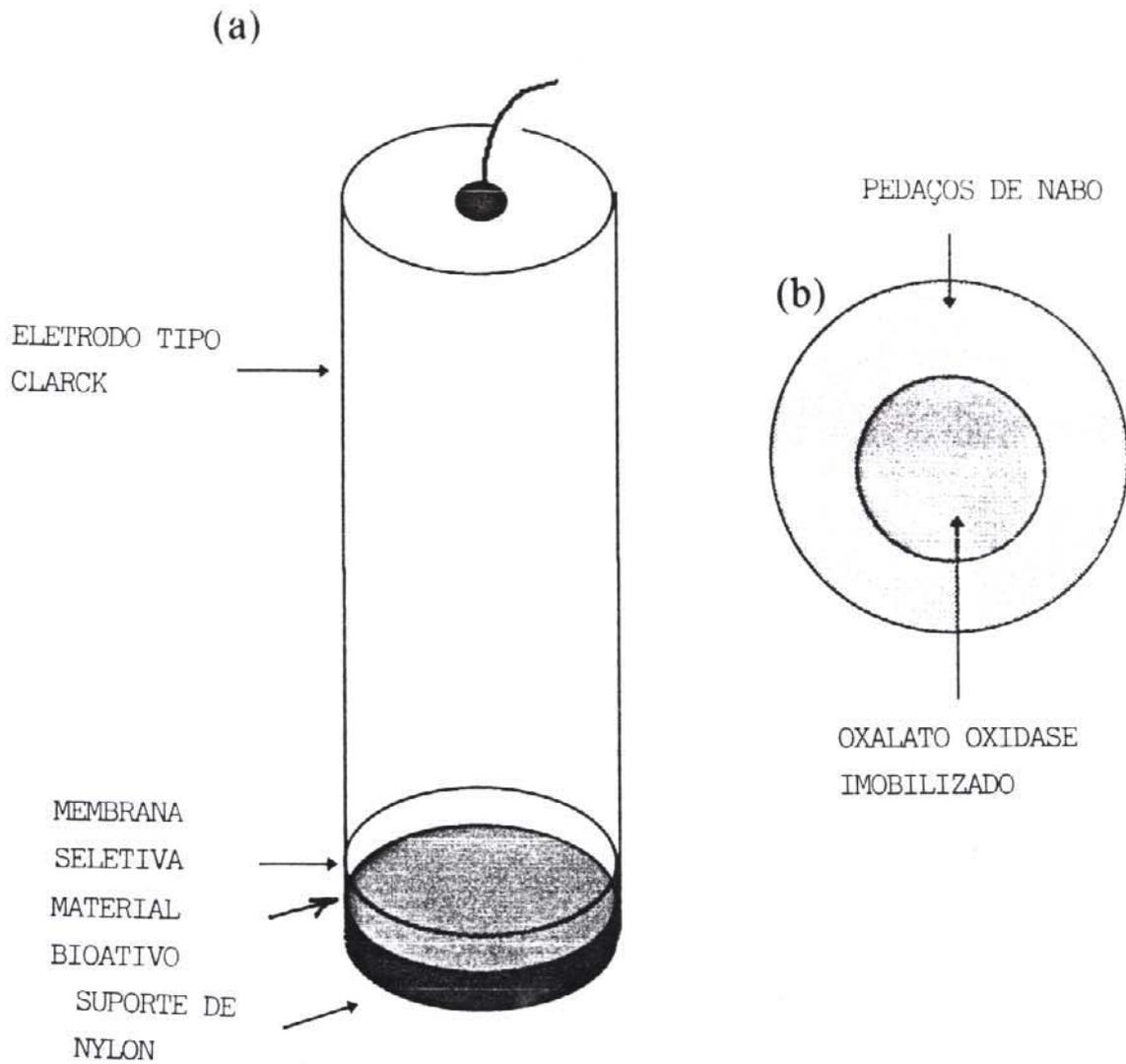


Figura III.19 - Desenho do biossensor bi-enzimático. (a) visão geral e (b) Vista frontal da extremidade do transdutor.

Com todas condições otimizadas, submeteu-se soluções padrões de ácido oxálico à presença do biossensor, tendo como resultado a curva analítica ilustrada na Figura III.20.

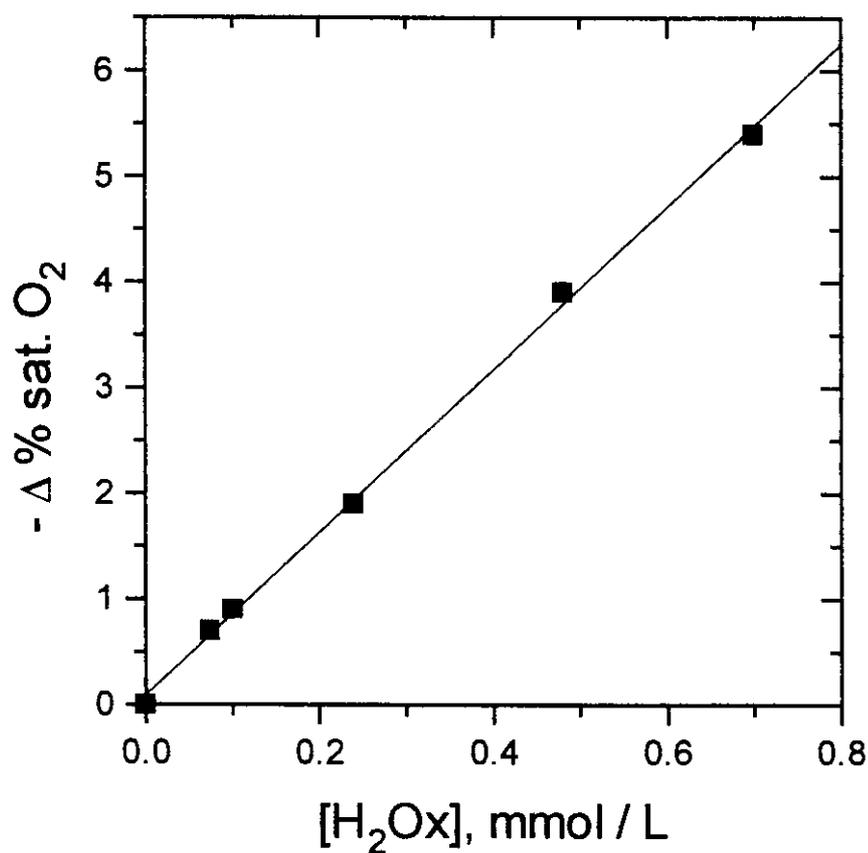


Figura III.20 - Curva analítica para o biossensor bi-enzimático. Condições idênticas à Figura III.18.

Fazendo-se uma regressão linear chegou-se à relação: $Y = 0,08753$ (s.d. 0,05358) + 7,701 (s.d. 0,1473)X, R 0,9993 (s.d. 0,08962) para N=6 A expressão é válida para o intervalo de 0,080 a 0,70 mmol / L.

Nas explorações a respeito das principais interferências, notou-se pela análise da Figura III.21, que os L-aminoácidos aumentaram os sinais analíticos.

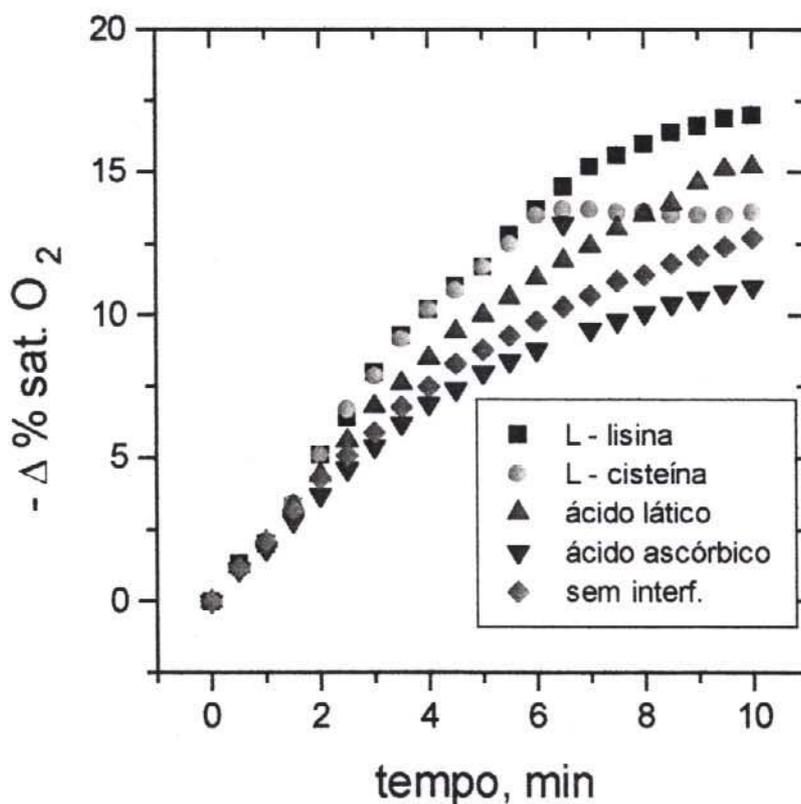
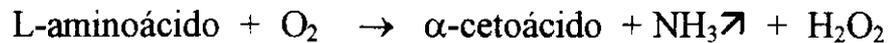


Figura III.21 - Comportamento cinético do biossensor frente às interferências mais comuns para análises de oxalato. Condições: $[H_2Ox]$ 0,48 mmol / L; [interferentes] 0,20 mmol/L ; T 27,0°C e pH = 4,0.

Isto aconteceu provavelmente devido à presença da enzima L-aminoácido oxidase que catalisa a reação:



Além de consumir oxigênio, geraria mais peróxido para ser decomposto pela enzima peroxidase, o que explicaria os aumentos observados. Por outro lado, o ânion ascorbato, um bom redutor em solução aquosa, contribui para diminuir as variações. Provavelmente existe uma competição reacional deste redutor com as espécies oxidadas do sistema enzimático como um todo. Apesar disso, todos estes interferentes estudados não afetam o desempenho do biossensor, no tempo de dois minutos de reação. Na Tabela III.4, estão apresentados os estudos das interferências dos íons metálicos Al^{3+} , Fe^{2+} e Cu^{2+} com concentrações fixas ($5,0 \times 10^{-4}$ mol / L).

Tabela III.4 - Interferências de alguns íons metálicos sobre a resposta do biossensor bi-enzimático. Condições: temperatura, 27,0^oC; pH 4,0(ácido succínico 0,05 mol / L com 1,0 mmol / L de Na₂H₂EDTA quando adicionado) e variações registradas em 2 minutos de reação.

CONDIÇÃO →	COM Na ₂ H ₂ EDTA					SEM Na ₂ H ₂ EDTA				
↓ [H ₂ Ox] [▼]	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
s/ interferência	0,3	0,6	0,7	1,0	1,4	0,6	1,3	2,0	3,1	4,0
com Al ³⁺	0,1	0,3	0,4	0,4	0,5	0,2	0,4	0,6	0,8	0,8
com Fe ²⁺	1,0	2,1	2,7	3,2	3,8	3,8	6,8	9,0	10,3	11,1
com Cu ²⁺	0,3	0,7	1,1	1,5	2,1	0,2	0,5	0,9	1,1	1,1

▼concentração de ácido oxálico em mmol / L. Valores expressos em -Δ% de saturação de oxigênio.

Pelos resultados, pode-se afirmar que a presença do EDTA não tem muito significado quando se considerada as interferências de alumínio (III) e Cobre(II). Em contra partida a presença do íon Fe(II) livre, atua de maneira significativa o biossensor. Para a enzima purificada e solúvel, este fenômeno já foi observado^(71,72).

Analisaram-se folhas de espinafre com quinze dias de idade, obtendo-se 0,56 mmol de ácido oxálico solúvel em 3,60 g do material seco analisado. Com isso e considerando-se os fatores de diluição, chegou-se a 3120 mg de ácido oxálico por 100g do material seco, compatível com o valor da literatura⁽¹³⁸⁾(3390 mg / 100g). A diferença obtida pode ser atribuída às diferentes condições climáticas, amostragem e variedade do vegetal. O valor obtido foi semelhante àquele medido segundo procedimento da Sigma[®].

IV. CONCLUSÕES

- O conjunto eletrodo sensível a CO₂-reator tipo “stirring bar” com a enzima naturalmente imobilizada no sorgo, não se mostrou adequado para uso em amostras reais.
- A enzima proveniente do sorgo apresenta maior afinidade pelo ácido oxálico em relação à mesma enzima de cevada, conforme valores das constantes aparentes de Michaelis-Menten.
- Medidas em fluxo com eletrodo sensível a CO₂ e reator enzimático, necessariamente exigem velocidades de fluxo muito baixas, para observação de sinal analítico razoável, limitando muito, sua utilização em condições reais de análise.
- As metodologias baseadas em FIA condutométrico e espectrofotométrico, mostraram-se viáveis para análises de urina e capins para pastagem, respectivamente.
- O biossensor constituído pela sonda sensível a O₂, mais as enzimas oxalato oxidase e peroxidase (não purificada), constituem um dispositivo de baixo custo, boa seletividade e aplicável à determinação de oxalato em amostras de espinafre. A presença de peroxidase, favoreceu sensivelmente a reação final, aumentando o sinal analítico.

- A imobilização de espécies bioativas, principalmente enzimas, sobre matrizes naturais ativadas, caracteriza uma nova metodologia, de grande potencialidade de aplicação pela maior estabilidade apresentada.

V. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nas experiências teórico-práticas adquiridas, pode-se visualizar os seguintes horizontes em relação ao assunto:

- Desenvolvimento de biotecnologia de purificação da enzima oxalato oxidase de fontes naturais disponíveis no Brasil com a finalidade de elaborar Kits para determinações em amostras de interesse biológico. Procedimento semelhante pode ser proposto para a enzima oxalato descarboxilase.
- Exploração de outras fontes enzimáticas, como caruru, banana, beterraba, musgo, raiz de cevada, microorganismos, etc. Naturalmente imobilizadas ou com quantidades adicionais sobre a matriz natural ativada.
- Construção de biossensores potenciométricos com as enzimas baseadas em oxalato oxidase ou oxalato descarboxilase com peroxidase, usando eletrodo sensível a CO₂.
- Construção de biossensores baseados na incorporação de enzimas e mediadores, em superfícies de eletrodos (platina, carbono vítreo, ouro, etc) modificados com filmes poliméricos (polipirrol, polianilina e politiofeno).
- A amplificação das reações enzimáticas envolvendo oxalato nos processos de imobilização, explorando a possível participação do cofator flavina adenina dinucleotídeo(FAD).

- Construir biossensores baseados na imobilização de partes do DNA humano, que contenham as informações genéticas relacionadas com a hiperoxaluria, objetivando o diagnóstico clínico da doença.
- Estudar os mecanismos de funcionamento das enzima oxalato oxidase e oxalato descarboxilase, no “habitat” natural, bem como os fenômenos a nível de membrana celular.
- Desenvolvimento de sensores ópticos com enzimas imobilizadas sobre superfícies de fibras ópticas, visando determinações *in vivo*.

VI. BIBLIOGRAFIA

- 1 - JOLY, A. B. “Botânica - Introdução à taxonomia vegetal”, 3^a. ed.,
Companhia Editora Nacional, São Paulo, **1976**.
- 2 - MADIGAN, D.; MCMURROUGH, I. and SMYTH, M. R.;
“Determination of oxalate in beer and beer sediments using ion
chromatography”; Journal of the American Society of Brewing
Chemists, 52(3) : 134-137, **1994**.
- 3 - CARVALHO, F.; BASTOS, M. L.; REMIÃO, F. and FERREIRA, M. A.;
“Determination of oxalates in cork stoppers by HPLC with
electrochemical detection”; American Journal of Enology and
Viticulture, 46(1) : 63-66, **1995**.
- 4 - JOESTEN, M. D.; JOHNSTON, D. O.; NETTERVILLE, J. T. and
WOOD, J. L.; “World of chemistry”; Saunders College Publishers,
USA, **1991**.
- 5 - WINSTON, J. S.; YEH, I. T.; EVERS, K. and FRIEDMAN, A. K.;
“Calcium oxalate is associated with benign breast tissue - can we
avoid biopsy”, American Journal of Clinical Pathology, 100 : 488-
492, **1993**.

- 6 - COYNE, J.; AL NABIL, L.; GOLDSMITH, D. and O'FLYNN, K.
“Secondary oxalosis and sperm granuloma of the epididymis”,
Journal of Clinical Pathology, 47(5) : 470-471, 1994.
- 7 - WAHL, R. and KALEE, E., “Oxalic acid in saliva, teeth and tooth tartar”,
European Journal of Clinical Chemistry and Biochemistry, 32 :
821-825, 1994.
- 8 - JONES, R. J. and FORD, C. W., “Some factors affecting the oxalate
content of the tropical grass Setaria sphacelata”, Australian Journal
of Experimental Agriculture Animal Husb., 12(57) : 400-406, 1972.
- 9 - SEAWRIGHT, A. A.; GROENENDYK, S. and SILVA, K. I. N. G.; “An
outbreak of oxalate poisoning in cattle grazing Setaria sphacelata”;
Australian Veterinary Journal, 46(7) : 293-296, 1970.
- 10 - GONZALEZ, R. and COWARD, J., “Efecto del intervalo de corte y la
fertilización nitrogenada en el contenido de ácido oxálico del pasto
San Juan (Setaria sphacelata) en dos zonas de Costa Rica”,
Agronomía costaricense, 1(1) : 17-22, 1977.
- 11 - SCHENK, M. A. M.; FARIA FILHO, T.T.; PEMENTEL, D. M. e
THIAGO, L. R. S.; “Intoxicação por oxalatos em vacas lactantes

- em pastagem de setaria”; Pesquisas Agropecuárias Brasileiras, 17(9) : 1403-1407, 1982.
- 12 - GROENENDYK, S. and SEAWRIGH, T., “Osteodystrophia fibrosa in horses grazing Setaria sphacelata; Australian Veterinary Journal, 50(3) : 131-132, 1974.
- 13 - WHALTHALL, J. C. and MCKENZIE, R. A., “Osteodystrophia fibrosa in horses at pastures in Queensland : Field and laboratory observations”, Australian Veterinary Journal, 52 : 11-16, 1976.
- 14 - LUCK, P. E., “Setaria - a important pasture grass”, Queensland Agriculture Journal, 105(2) : 136-144, 1979.
- 15 - JONES, R. J. and FORD, C. W.; “The soluble oxalate content of some tropical grasses grown in south-east Queensland”, Tropical Grasses, 6 (3) : 201-204, 1972.
- 16 - PIMENTEL, D. M. e THIAGO, L. R. S., “Oxalatos totais em Setaria anceps CV. Kazungula”, Embrapa-CNPGC (comunicado técnico), Campo Grande-MS, 1982.
- 17 - SMITH, F. W., “Potassium nutrition, ionic relations, and oxalic acid accumulation in three cv. of Setaria sphacelata, Australian Journal of Agriculture Research, 23(6) : 969-980, 1972.

- 18 - MATHAMS, R. H. and SUTHERLAND, A. K., "The oxalate content of some Queensland pastures plants", Queensland Journal of Agricultural Sciences", 9(4) : 317-334, **1952**.
- 19 - DONNÉ, M. A., "Tableau des différents dépôts de matières salines et de substances organisées qui se font dans les urines, présentant les caracteres propre à les distinguer entre eux et a reconnaître leur nature", Compts Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Académie des Sciences, 6 : 419, **1838**.
- 20 - DONNÉ, M. A., "Sur la formation de cristaux d'oxalate de chaux dans l'urine déterminée par l'usage de l'oseille", Compts Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, 8 : 805-806, **1839**.
- 21 - BIRD, G., "Urinary deposits, their diagnosis, pathology and therapeutical indications", John Churchill, London, pp 207-249, **1853**.
- 22 - REOCH, J., "Oxaluria", Lancet, 2 : 309-310 e 342-343, **1875**.
- 23 - LEHMANN, G. G. "Physiological Chemistry", 2nd Ed., Vol I, Cavendish Society, London, pp 41-48, **1851**.

- 24 - NEUBAUER, C. and VOGEL, J.; “ A guide to the qualitative and quantitative analysis of the urine designed especially for the use of medical men”; 4th. ed.; Sydenham Society, London, **1863**.
- 25 - SALKOWSKI, E., “Veber die bestimmung der oxalsäure und das vorkommen von oxalsäure im harn”, Hoppe-Seyler’s Zeitschrift für Physiologische Chemie, 29 : 437-460, **1900**.
- 26 - DAKIN, H. D., “Experiments bearing upon the mode of oxidation of simple aliphatic substances in the animal organism”, Journal of Biological Chemistry, 3 : 57-59, **1907**.
- 27 - MARGUERITTE, F., “Sur un nouveau procédé de dosage du fer par la voie humide”, Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l’Académie des Sciences, 22 : 587-591, **1846**.
- 28 - HARCOURT, A. V. and ESSON, W.; “On the laws of connexion between the conditions of a chemical change and its amount”; Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 156 : 193-221, **1866**.
- 29 - DORRONSORO, B. and FERNÁNDEZ, O. “Acerca de la reaccion del ácido, noplínico (reaccion caracteristica del ácido oxálico). Annales

- de la Real Sociedad Española de Física y Química, 11 : 441-443, **1913**.
- 30 - CHERNOFF, L. H., "A color test for oxalic acid", Journal of the American Chemical Society, 42 : 1784-1785, **1920**.
- 31- ALLEN, M. B., "Excretion of Organic Compounds by chlamidomonas", Archives für Mikrobiologie, 24 : 163-168, **1956**.
- 32 - STERN, F.; GRUMET, G.; TRABAL, F.; MENNIS, A. and ZINSSER, H. H.; "Paper Chromatographic studies of urinary organic acids", 19 : 130-146, **1965**.
- 33 - MARTIN, S. M., "A spray reagent for identification of organic acids", Chemistry and Industry, 427 : 428, **1955**.
- 34 - BADRINAS, A. and AGUILA SANCHO, J. F., "The chromatographic development of nonvolatile mono-, di and tricarboxylic acids with a fluorescent indicator", Publications del Instituto de Biologia Aplicada (Barcelona), 28 : 81-85, **1958**.
- 35 - ROUGHAN, P. G. and SLACK, C. R., "Simple methods for routine screening and quantitative estimation of oxalate content of tropical grasses", Journal of the Science of Food and Agriculture, 24 : 803-811, **1973**.

- 36 - FRANCE, N. C. and WALLACE, M. R., "Measurement of plasma oxalate by capillary gas chromatography and its validation by isotope dilution mass spectrometry", Journal of Chromatography, 433 : 1-7, **1988**.
- 37 - PETRARULO, M.; BIANCO, O.; MARANGELLA, M.; PELLEGRINO, S.; LINARI, F. and MENTASTI, E.; "Ion chromatographic determination of plasma oxalate in healthy subjects, in patients with chronic failure and in case of hyperoxaluria syndromes", Journal of Chromatography, 511 : 223-231, **1990**.
- 38 - WANDZILAK, T.R.; HANSON, F.W. and WILLIAMS, H. E.; "The quantification of oxalate in amniotic fluid by ion-chromatography", Clinica Chimica Acta, 185 : 131-138, **1989**.
- 39 - BARNETT, N. W.; BOWSER, T. A. and RUSSEL, R. A.; "Determination of oxalate in alumina process liquors by ion chromatography with post column chemiluminescence detection", Analytical Proceedings, 32 : 57-59, **1995**.
- 40 - ISHII, Y., "Extraction and ion chromatographic determination of free and combined oxalic acid in vegetables", Analytical Sciences, 7 : 263-266, **1991**.

- 41 - PETRARULO, M. and MARANGELLA, M., "Proper handling of blood samples is crucial for the accurate ion chromatographic determination of oxalate"- letter to the editor, Clinica Chimica Acta, 189 : 249-252, 1990.
- 42 - MILLÁN, A.; GRASSES, J. M.; GRASSES, J. M.; "Rapid determination of urinary oxalate by high-performance liquid chromatography"- Note , Journal of Chromatography, 529 : 402-407, 1990.
- 43 - BREGA, A.; QUADRI, A.; VILLA, P.; PRANDINI, P.; JI-QING, WEI and LUCARELLI, C.; "Improved HPLC determination of plasma and urine oxalate in the clinical diagnostic laboratory", Journal of Liquid chromatography, 15(3) : 501-511, 1992.
- 44 - SAMUEL, C. T.; Urologycal Research, 16 : 1, 1988.
- 45 - MENON, M. and MAHLE, C. J., "Ion chromatographic measurement of oxalate in unprocessed urine", Clinical Chemistry, 29(2) : 369-371, 1983.
- 46 - MARTZ, F. A., "Determination of oxalate in forage by reversed-phase high pressure liquid chromatography", Journal Dairy Science, 73(2) : 474-479, 1990.

- 47 - YAMATO, S.; WAKABAYASHI, H.; NAKAJIMA, M. and SHIMADA, K.; "Amperometric determination of oxalate in plasma and urine by liquid chromatography with immobilized oxalate oxidase", Journal of chromatography B Biomedical Applications, 656(1) : 29-35, **1994**.
- 48 - SANTOS, L. M. and BALDWIN, R. P., "Profiling of oxalic acid and α -keto acids in blood and urine by liquid chromatography with electrochemical detection at a chemically modified electrode", Journal of Chromatography, 414 : 161-166, **1987**.
- 49 - SKOTTY, D. R. and NIEMAN, T. A., "Determination of oxalate in urine and plasma using reversed-phase ion pair high-performance liquid chromatography with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-electrogenerated chemiluminescence detection", Journal of Chromatography B, 665 : 27-36, **1995**.
- 50 - RODRIGUES, J. A. and BARROS, A. A. "Development of a method for oxalate determination by differential-pulse polarography after derivatization with o-phenylenediamine", Analytica Chimica Acta, 273 : 531-537, **1993**.

- 51 - MITCHELL, G.A., "A colorimetric method for determining oxalic acid", Analyst, 58 : 279, 1933.
- 52 - BURROWS, S., "A colorimetric method for the determination of oxalate", Analyst, 75 : 80-84, 1950.
- 53 - HAUSMAN, E. R.; McNALLY, J. S. and LEWIS, G. T.; "Determination of oxalate in urine", Clinical Chemistry, 2 : 439-444, 1956.
- 54 - PAGET, M. and BERGER, R., "Recherches sur la réaction de Schryver-Fosse et sur ses applications analytiques", Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, 207 : 800-802, 1938.
- 55 - HODGKINSON, A. and WILLIAMS, A., "An improved colorimetric procedure for urine oxalate", Clinica Chimica Acta, 36 : 127-132, 1972.
- 56 - DUTT, V. V. S. and MOTTOLA, H. A., "Detection and initial rate determination of oxalic acid at the microgram level", Biomedical Medicine, 9 : 148-157, 1974.
- 57 - SALINAS, F.; MARTINEZ-VIDAL, J. L. and GONZALEZ-MURCIA, V.; "Extraction - Spectrophotometric determination of oxalate in urine and blood serum", Analyst, 114 : 1685-1687, 1989.

- 58 - BAADENHUIJSEN, H. and JANSEN, A. P., "Colorimetric determination of urinary oxalate recovered as calcium oxalate. Application of a simple correction factor for incomplete precipitation", Clinica Chimica Acta, 62 : 315-324, 1975.
- 59 - ALBRECHT, S.; BRANDT, H.; BOHM, W. D.; BECHERT, R.; KROSCHWITZ, H. and NEUMEISTER, V.; "Determination of urinary oxalate and porphyrins by peroxyoxalate chemiluminescence", Analytica Chimica Acta, 255 : 413-416, 1991.
- 60 - ALBRECHT, S. "Determination of serum oxalate using peroxyoxalate chemiluminescence of free oxalic acid", Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence 8 : 21-24, 1993.
- 61 - EGASHIRA, N.; KUMASAKO, H.; KURAUCHI, Y. and OHGA, K., "Determination of oxalate in vegetables with a fiber-optic electrochemiluminescence sensor", Analytical Sciences, 8 : 713-714, 1992.
- 62 - SHIMAZONO, H., "Oxalic acid decarboxylase, a new enzyme from the mycelium of wood-destroying fungi", Journal of Biochemistry, 42 : 321-340, 1955.

- 63 - CRAWHALL, J. C. and WATTS, R. W. E., "The oxalate content of human plasma", Clinical Science, 20 : 357-366, 1961.
- 64 - MAYER, G. G.; MARKOW, D. and KARP, F.; "Enzymatic oxalate determination in urine", Clinical Chemistry, 9 : 334-339, 1963.
- 65 - RIBEIRO, M. E., and ELLIOT, J. S., "Direct enzymatic determination of urinary oxalate", Investigative Urology, 2 : 78-81, 1964.
- 66 - HALLSON, P. C. and ROSE, G. A., "A simplified and rapid enzymatic method for determination of urinary oxalate", Clinica Chimica Acta, 55 : 29-39, 1974.
- 67 - KNOWLES, C. F. and HODGKINSON, A., "Automated enzymic determination of oxalic acid in human serum", Analyst, 97 : 474-481, 1972.
- 68 - JACOBY, W. B., "Enzymatic decarboxylation of oxalic acid", Federation Proceedings, 15 : 282, 1956.
- 69 - COSTELLO, J.; HATCH, M. and BOURKE, E.; "A enzymic method for the spectrophotometric determination of oxalic acid", Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 87 : 903-908, 1976.

- 70 - CHIRIBOGA, J. "Some properties of an oxalic oxidase purified from barley seedlings", Biochemical and Biophysical Research Communications, 11(4) : 1963.
- 71 - PUNDIR, C. S. and NATH, R., "Occurrence of an oxalate oxidase in *Sorghum* leaves", Phytochemistry, 23(9) : 1871-1874, 1984.
- 72 - PUNDIR, C. S. and KUCHHAL, N. K., "Detection of an oxalate oxidase in grain sorghum roots", Phytochemistry, 28(11) : 2909-2912, 1989.
- 73 - SATYAPA, L. and PUNDIR, C. S., "Purification and properties of an oxalate oxidase from leaves of grain sorghum hybrid CSH-5", Biochimica et Biophysica Acta, 1161(1) : 1-5, 1993.
- 74 - KOYAMA, H., "Purification and characterization of oxalate oxidase from *Pseudomonas* sp OX-53", Agriculture and Biological Chemistry, 52(3) : 743-748, 1988.
- 75 - MONGKOLISIRIKIEAT, S. and SRISUWAN, C., "Purification and characterization of oxalate oxidase from spiny pigweed", Journal of Science Society of Thailand, 13 : 169-177, 1987.

- 76 - RAGHAVAN, K. G. and DEVASAGAYAM, T. P. A., "Oxalate oxidase from banana peel for determination of urinary oxalate" - Letter to editor, Clinical Chemistry, 31(4) : 649, 1985.
- 77 - KOHLBECKER, G.; RICHTER, L. and BUTZ, M.; "Determination of oxalate in urine using oxalate oxidase : comparison with oxalate decarboxylase", Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 17(5) : 309-313, 1979.
- 78 - LI, M. G. and MADAPPALLY, M., "Rapid enzymatic determination of urinary oxalate", Clinical Chemistry, 35(12) : 2330-2333, 1989.
- 79 - BARLOW, I. M. and HARRISON, S. P., "Improved urinary oxalate kit" - Letter to editor, Clinical Chemistry, 36(8) : 1523, 1990.
- 80 - LATHIKA, K. M.; INAMDAR, K. V.; TARACHAND, U.; SINGH, B. B. and RAGHAVAN, K. G.; "Determination of urinary oxalate using banana oxalate oxidase: comparison with immobilized enzyme", Analytical Letters, 28(3) : 425-442, 1995.
- 81 - HULANICKI, A.; GLAB, S. and INGMAN, F., "Chemical sensors definitions and classification", Pure and Applied Chemistry, 63(9) : 1247-1250, 1991.

- 82 - ROE, J. N., "Biosensor development", Pharmacological Research, 9(7) : 835-844, 1992.
- 83 - LUONG, J. H. T., GROOM, C. A. and MALE, K. B., "Potential role of biosensors in the food and drink industries", Biosensors and Bioelectronics, 6(7) : 547-554, 1991.
- 84 - GALAN-VIDAL, C. A.; MUNOZ, J.; DOMINGUEZ, C. and ALEGRET, S., "Chemical sensors, biosensors and tick film technology", Trac-Trends in Analytical Chemistry, 14(5) : 225-231, 1995.
- 85 - PANDEY, P. C., "Membrane electrodes as biosensor", Bulletin of Electrochemistry, 8(5) : 212-221, 1992.
- 86 - BARCELÓ, D., "Biosensors for environmental monitoring", Trac-Trends in Analytical Chemistry, 14(7) : 289-378, 1995.
- 87 - OLIVEIRA NETO, G. and YAMANAKA, H.; "Enzimas e materiais biológicos imobilizados : Biossensores", Química Nova, 11(4) : 432-435, 1988.
- 88 - YAO, S. J.; WOLFSON, S. K. and TOKARSKY, J. M.; "Enzymatic - potentiometric determination of oxalic acid", Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 2 : 348-350, 1975.

- 89 - KOBOS, R. K. and RAMSEY, T. A., "Enzyme electrode system for oxalate determination utilizing oxalate decarboxylase immobilized on a carbon dioxide sensor", Analytica Chimica Acta, 121 : 111-118, 1980.
- 90 - NABI RAHNI, M. A.; GUILBAULT, G. G. and OLIVEIRA NETO, G.; "Immobilized enzyme electrode for the determination of oxalate in urine"; Analytical Chemistry, 58 : 523-526, 1986.
- 91 - DINCKAYA, E. and TELEFONCU, A.; "Enzyme electrode based on oxalate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of oxalate"; Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 30(5) : 282-284, 1994.
- 92 - AMINI, M. A. S.; VALLON, J. J. and BICHON, C.; "Mesure de l'oxalate par une electrode a oxalate - oxydase immobilisee sur membrane de collagene"; Analytical Letters, 22(1) : 43-59, 1989.
- 93 - ASSOLANT-VINET, C. H.; BARDELETTI, G. and COULET, P. R.; "A novel enzyme membrane electrode for oxalate determination in foodstuffs"; Analytical Letters, 20(4) : 513-527, 1987.
- 94 - REDDY, S. M.; HIGSON, S. P. J.; CHRISTIE, I. M. and VADGAMA, P. M.; "Selective membranes for the construction and optimization of

- an amperometric oxalate enzyme electrode”; Analyst, 119 : 949-952, **1994**.
- 95 - GLAZIER, S. A. and RECHNITZ, G. A.; “Construction and characterization of a beet stem based biosensor for oxalate”; Analytica Letters, 22(15) : 2929-2948, **1989**.
- 96 - FONONG, T., “Comparative study of potentiometric and amperometric tissue-based electrodes for oxalate”, Analytica Chimica Acta, 186 : 301-305, **1986**.
- 97 - BRADLEY, C. R. and RECHNITZ, G. A.; “Comparison of oxalate oxidase enzyme electrodes for urinary oxalate determination”; Analytical Letters, 19(1-2) : 151-162, **1986**.
- 98 - DANHUA, C; LUQUE DE CASTRO, M. D. and VALCÁRCEL, M.; “Determination of anions by flow injection analysis - A Review”, Analyst, 116 : 1095-1111, **1991**.
- 99 - GORTON, L.; CSOREGI, E.; DOMINGUEZ, E.; EMNÉUS, J.; JONSSON-PETTERSON, G.; MARKO-VARGA, G. and PERSON, B.; “Selective detection in flow analysis based on the combination of immobilized enzymes and chemically modified electrodes”, Analytica Chimica Acta, 250 : 203-248, **1991**.

- 100 - VADGAMA, P.; DESAI, M. A.; CHRISTIE, I. and KOOCHAKI, Z.;
“Chemical sensors and biosensors : nearer the patient”, Pure and Applied Chemistry, 63 : 1147-1152, 1991.
- 101 - WANG, J., “Electroanalysis and biosensors”, Analytical Chemistry, 67(12) : 487r-492r, 1995.
- 102 - KASIDAS, G. P. and ROSE, G. A., “Measurement of plasma oxalate in healthy subjects and in patients with chronic renal failure using immobilized oxalate oxidase”, Clinica Chimica Acta, 154 : 49-58, 1986.
- 103 - POTEZNY, N.; BAIS, R.; O’LOUGHLIN, P. O.; EDWARDS, J. B.; ROFE, A. M. and CONYERS, A. J.; “Urinary oxalate determination by use of immobilized oxalate oxidase in a continuous-flow system”; Clinical Chemistry, 29(1) : 16-20, 1983.
- 104 - MATSUBARA, C.; SAKAI, C. and TAKAMURA, K.; “FIA [flow-injection analysis] of urine oxalate by the titanium(IV)-4-(2'-pyridylazo)resorcinol reagent”; Bunzeki-Kagaku, 40(7) : 343-347, 1991.
- 105 - BAIS, R.; POTEZNY, N.; EDWARDS, J. B.; ROFE, A. M. and CONYERS, A. J.; “Oxalate determination by immobilized oxalate

- oxidase in a continuous flow system"; Analytical Chemistry, 52 : 508-511, 1980.
- 106 - YRIBERRI, J. and POSEN, S., "A semi-automatic enzymic method for estimating urinary oxalate", Clinical Chemistry, 26(7) : 881-884, 1980.
- 107 - ALLEN, L. C.; KADLJEVIC, L.; and ROMASCHLH, A. D.; "An enzymatic method for oxalate automated with the cobas fara centrifugal analyzer"; Clinical Chemistry, 35(10) : 2098-2100, 1989.
- 108 - INFANTES, J. A.; LUQUE DE CASTRO, M. D. and VALCÁRCEL, M.; "Kinetic-enzymatic determination of oxalate in urine by flow-injection analysis with double stopped flow"; Analytica Chimica Acta, 242 : 179-183, 1991.
- 109 - PARKINSON, I. S.; CHANNON, S. M.; TOMSON, C. R. V.; ADONAI, L. R.; WARD, M. K. and LAKER, M. F.; "The determination of plasma oxalate concentrations using an enzyme / bioluminescent enzymes and studies of in vitro oxalogenesis"; Clinica Chimica Acta, 179 : 97-108, 1989.

- 110 - HANSEN, E. H.; WINTHER, S. K. and GUNDSTRUP, M.; “Enzymatic assay of oxalate in urine by flow injection analysis using immobilized oxalate oxidase and chemiluminescence detection”; Analytical Letters, 27(7) : 1239-1253, 1994.
- 111 - ALMUAIBED, A. M. and TOWNSHEND, A., “Amperometric determination of oxalate with immobilized oxalate oxidase”, Analytica Chimica Acta, 218(1) : 1- 6, 1989.
- 112 - FOGG, A. G.; ALONSO, R. M. and FERNANDEZ-ARCINIEGA, M. A.; “Oxidative amperometric flow-injection determination of oxalate at an electrochemically pre-treated glassy carbon electrode”; Analyst, 111(2) : 249-251, 1986.
- 113 - LEON, L. E.; RIOS, A.; LUQUE DE CASTRO, M. D. and VALCÁRCEL, M.; “Use of photochemical reactions in flow injection : Determination of oxalate in urine”; Analyst, 115 : 1549-1551, 1990.
- 114 - LEON, L. E.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; and VALCÁRCEL, M.; “Integrated photochemical reaction - electrochemical detection in flow injection systems : kinetic determination of oxalate”; Analytica Chimica Acta, 234(1) : 227-232, 1990.

- 115 - INFANTES, J.A.; LUQUE DE CASTRO, M. D. and VALCÁRCEL, M.;
“Flow injection method for the determination of oxalate in urine
based on a promoting effect”; Journal of Pharmalogical and
Biomedical Analysis, 10(1) : 95-98, **1992**.
- 116 - INFANTES, J. A.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; VALCÁRCEL, M.;
“Flow injection determination of oxalate in urine based on an
inhibitory effect”; Fresenius' Journal Analytical Chemistry, 339(1)
: 58-61, **1991**.
- 117 - GAETANI, E.; LAURERI, C. F.; VITTO, M.; BORGHI, L.; ELIA, G. F.
and NOVARINI, A.; “Determination of oxalate in urine by flow
injection analysis”; Clinica Chimica Acta, 156 : 71-76, **1986**.
- 118 - UCHIMURA, K., “Determination of oxalate by flow-injection analysis
with electrogenerated chemiluminescence detection”, Bunzeki
Kagaku, 36(6) : 323-326, **1990**.
- 119 - PEREZRUIZ, T.; MARTIZEZLOZANO, C. and SANZ, A.; “Flow-
injection determination of oxalate by a photoinduced
chemiluminescent reaction”; Analytica Chimica Acta, 284(1) :
173-179, **1993**.

- 120 - NOMURA, T. and SHIBUKAWA, Y., "Determination of oxalate by the single drop method using an electrodeless piezoelectric quartz crystal", Bunzeki Kagaku, 43(9) : 715-718, 1994.
- 121 - TUBINO, M. "A Conductimetric Detector for Flow Injection Analysis", Journal of Flow Injection Analysis, 11 : 94-96 , 1994.
- 122 - PASQUINI, C. and FARIA, L. C., "Flow Injection Determination of Ammonia in Kjeldahl Digests by Gas Diffusion and Conductometry", Analytica chimica Acta, 193 : 19-27, 1987.
- 123 - BARROS, F. G. "Determinação colorimétrica e condutométrica de acidez volátil de vinagres e vinhos por injeção em fluxo". Tese de mestrado, Unicamp, pp 33-37, 1990.
- 124 - KOSHCHEYENKO, K. A. and SUKHODOLSKAYA, G. V. : Immobilized cells -Transformation in Steroids. In : WOODWARD, J. "Immobilized Cells and Enzymes - A practical Approach". IRL press, Washington-DC, 1985.
- 125 - ROCHELETTI, R. ; TIFI, A. and MANCINELLI, L. "Le Biotecnologie a scuola". La chimica nella scuola, 5-6 : 31, 1990.

- 126 - Sigma-Diagnostics[®], "Quantitative Enzymatic Determination of Oxalate Concentration in Urine at 590 nm", Procedure 591, St. Louis, **1990**.
- 127 - SCOUTEM, W. H.; LUONG, J. H. and BROWN, S., "Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design", TIBTECH, 13 : 178-185, **1995**.
- 128 - DENG, J.; FANG, Y. and CAI, R.; "Soybean meal tissue based membrane bioelectrode for urea", Electroanalysis, 3 : 767-771, **1991**.
- 129 - GUILBAULT, G. G. and SHU, F. R., "Enzymic sensor based on the use of a carbon dioxide sensor. Urea and L-tyrosine electrodes", Analytical Chemistry, 44(13) : 2161-2166, **1972**.
- 130 - TAKANO, S.; YUKIHIRO, K. and OHTSUKA, H.; "Determination of carbonates in detergents by a carbon dioxide gas selective electrode", Analytical Chemistry, 57(8) : 1523-1526, **1985**.
- 131 - GUILBAULT, G. G. and STOKBRO, W., "The immobilized enzyme stirrer Part I. A specific electrode for urea", Analytica Chimica Acta, 76 : 237-244, **1975**.

- 132 - AMINI, M. A. S. and VALLON, J. J., "Comparison of performance and analytical applications of two immobilized oxalate oxidase sensors", Analytica Chimica Acta, 299 : 75-79, **1994**.
- 133 - VADGAMA, P.; SHELDON, W; GUY, J. M.; COVINGTON, A. K.; and LAKER, M. F.; "Simplified urinary oxalate determination using an enzyme electrode", Clinica Chimica Acta, 142 : 193-201, **1984**.
- 134 - "Biological Variations in urine samples used for analyte measurements", Clinical Chemistry, 40(3) : 472-477, **1994**.
- 135 - LINDBERG, A. O., "Detector system for oxalic acid based on the determination of carbon dioxide as methane after degradation of oxalate with glass-bound oxalate decarboxylase", Analytica Chimica Acta, 152 : 113-122, **1983**.
- 136 - CHOI, M. F. and HAWKINS, P., "Investigation of the response of dye-nonaqueous solvent solutions to carbon dioxide", Analytica Chimica Acta, 309 : 27-34, **1995**.
- 137 - NEIKOV, A. and SOKOLOV, S., "Generalized model for enzyme amperometric biosensors", Analytica Chimica Acta, 307 : 27-36, **1995**.

- 138 - SINGH, P. P. and SAXENA, S. N., "Effect of maturity on the oxalate and cation contents of six leafy vegetables", Indian Journal of Nutrition and Dietetics, 9 : 269-276, 1972.

CURRICULUM VITAE

I. DADOS PESSOAIS

NOME : João Roberto Fernandes

FILIAÇÃO : João Fernandes e Ana Maria Gomes Fernandes

ENDEREÇO : Av Luis Edmundo C. Coube s/n, Faculdade de

Ciências, Depto. de Química-Unesp, cep 17033-360, Fone

(0142)302111 ramal 134, fax (0142) 304470 e-mail

betopira@azul.bauru.unesp.br

II. FORMAÇÃO ACADÊMICA

GRADUAÇÃO : 1) Curso - Bacharelado em Química

Instituição - Unesp/Araraquara

2) Curso - Licenciatura em Química

Instituição - Unesp/Araraquara

PÓS-GRADUAÇÃO : 1) Mestrado em Química Inorgânica

Orientador - Prof. Dr. Luiz Antonio

Andrade de Oliveira

Instituição - Unesp/Araraquara

Período - 1985 a 1990

Título - “Cinética e Mecanismos de Reações de Transferência Eletrônica em complexos do tipo [Ru edta L]”

2) Doutorado em Química Analítica

Orientador - Prof. Dr. Graciliano de O. Neto

Instituição - IQ /UNICAMP

Período - 1991 a 1995

Título - “Metodologias Analíticas

Enzimáticas para análise de oxalato em

amostras de interesse biológico”

III. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS - 10 (DEZ)

IV. PUBLICAÇÕES

IV.1 FERNANDES, J. R.; SANTOS, A. A.; OLIVEIRA, L. A. A.; e BENEDEDETTI, A.V.; “Redução Eletroquímica de compostos de [Ru edta L] em meio aquoso”; Anais do VI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 19-26, 1988.

IV.2 FERNANDES, J. R.; KUBOTA, L.T.; GUSHIKEN, Y. and OLIVEIRA NETO, G.; “A New Sensor for Perchlorate Ion”; Analytical Letters, 26(12) : 2555-2563, 1993.

IV.3 FERNANDES, J. R.; KUBOTA, L. T; LORENCETTI, L.; GUSHIKEN, Y.; and OLIVEIRA NETO, G.; “Potentiometric Study Using

Silica Gel Chemically Modified with Pyridinium Ion as Membrane for ClO_4^- ;
Mikrochimica Acta, 117(3-4) : 239-244, 1995.

IV.4 FERNANDES, J. R.; OLIVEIRA NETO, G.; KUBOTA, L. T.; and TUBINO, M.; “Determination of oxalate in urine by using pure enzyme immobilised on **Sorghum vulgare** seeds in a flow injection conductimetric system”; Submetido para publicação na revista Journal of Brazilian Chemical Society.

IV.5 FERNANDES, J. R.; OLIVEIRA NETO, G.; TUBINO, M. and KUBOTA, L. T.; “Determination of Oxalate by Spectrophotometric Flow Injection in Grasses”; Submetido na Revista Analytical Sciences.

V. EXPERIÊNCIA DIDÁTICA

1) PRIMEIRO E SEGUNDO GRAUS - 03 (Três) anos

2) UNIVERSIDADE - 07 (sete) anos