

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA



UNICAMP



**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM
BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO À BASE DE
PEROXIDASE PARA DETERMINAÇÃO DE
NEUROTRANSMISSORES**

Tese de Doutorado apresentada à Comissão
de Pós-Graduação do Instituto de Química
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Aluna: Tânia Jacometo de Castilho
Orientador: Prof. Dr. Lauro T. Kubota

Campinas / 2003

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

Castilho, Tânia Jacometo de

C278d Desenvolvimento e avaliação de um biossensor
ampométrico à base de peroxidase para determinação de
neurotransmissores / Tânia Jacometo de Castilho. –
Campinas, SP : [s.n.],2003.

Orientador: Lauro T. Kubota

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Neurotransmissores. 2. Serotonina. 3. Biossensor
amperométrico. 4. Eletrodo de pasta de carbono. I. Kubota,
Lauro T. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

UNIDADE	<i>516</i>
Nº CHAMADA	<i>11/10/03</i>
V	EX
TOMBO BCI	<i>58705</i>
PROC.	<i>6.27.04</i>
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	<i>21,000</i>
DATA	<i>23-06-04</i>
Nº CPD	

00001 REE 04...

5.6.11.31/11/03

“Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo dos céus:

Tempo para nascer e tempo para morrer,

Tempo para plantar e tempo para arrancar o que foi plantado;

Tempo para rasgar e tempo para costurar,

Tempo para calar e tempo para falar;

Tempo para amar e tempo para odiar,

Tempo para a guerra e tempo para a paz”.

Eclesiastes 3, 1-2, 7, 8

DEDICADA

AOS MEUS FILHOS

Tiago, Matheus e Lucas
por fazerem tudo valer a pena

AO MEU MARIDO

Wellington
por me acompanhar nestes trinta anos

À MINHA MÃE

Izaura
pela sua admirável dedicação à família

e ...

*“De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estava sempre começando,
a certeza de que era preciso continuar
e a certeza de que seria interrompido antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo,
fazer da queda um passo de dança,
do medo, uma escada,
do sonho, uma ponte,
da procura, um encontro”.*
(Fernando Sabino)

.... AO MEU PAI

Olívio

por me ensinar a enfrentar a vida com otimismo e alegria

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Lauro, cuja persistência e sabedoria ao enfrentar sucessivos e importantes desafios são exemplos a serem seguidos, a minha mais sincera e profunda gratidão pela orientação, disponibilidade, compreensão e amizade.

À Dra. Simone Soares Rosatto pela atenção constante e animadora diante das dificuldades encontradas no início do trabalho.

À Dra. Maria del Pilar T. Sotomayor pela paciência e gentileza com que aceitou meus questionamentos, além da forma pronta com que sempre me auxiliou.

Aos colegas de grupo, pelo companheirismo, amizade e bom humor: Lucilene, Zana, Miyuki, Karin, Percy, Arnaldo, Jequié, Renata, Larissa, Altair, Alaécio e os novatos Rita e Flávio.

Aos demais companheiros dos grupos dos professores Ronei e Bertran.

À Miyuki, amiga sempre presente, que jamais permitiu que meus finais de semana, em Campinas, fossem solitários.

Às amigas de república: Edna, Mi, Patrícia, Simone e Telma.

À minha família pelo apoio que nunca faltou e por seu amor.

À minha cunhada Edna pelas inúmeras vezes em que atendeu meus filhos, enquanto estive estudando, e pela revisão lingüística desta tese.

Aos diretores e funcionários do Instituto de Química da UNICAMP, pela recepção e colaboração sempre recebidas.

À Universidade Estadual de Maringá e aos colegas do Departamento de Química, pela oportunidade.

À CAPES pela bolsa concedida.

Não posso deixar de agradecer de um modo muito especial ao meu filho Lucas, que numa idade muito difícil da vida, comportou-se como um grande homem.

CURRÍCULO

1 DADOS PESSOAIS

Nome: Tânia Jacometo de Castilho

Filiação: Olívio Jacometo e Izaura Bornia Jacometo

Nacionalidade: Brasileira

Estado civil: Casada

Nascimento: 04 de outubro de 1954

Naturalidade: Mandaguaçu – PR

Identidade: RG 988 184 – 0

CPF: 510823069 – 91

Título de Eleitor: 374155606 – 55

2 FORMAÇÃO

1. Curso Primário - Colégio São Francisco de Assis, concluído em 1965, Mandaguaçu – PR
2. Curso Ginásial - Colégio Estadual Governador Paulo Pimentel, concluído em 1969, Mandaguaçu – PR
3. Curso Científico - Colégio Estadual Dr. Gastão Vidigal, concluído em 1972, Maringá - PR
4. Licenciatura em Ciências – Curso de Licenciatura em Ciências, concluído em julho de 1975 na Universidade Estadual de Maringá, PR
5. Licenciatura em Química - Curso de Licenciatura em Química, concluído em julho de 1979 na Universidade Estadual de Maringá, PR
6. Especialista em Química – Curso de Especialização em Química, concluído em 1982 na Universidade Estadual de Londrina, PR
7. Mestre em Química dos Processos Catalíticos, concluído em 02/11/1990, no Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa – Portugal. Título da Dissertação: “Estudo Electroquímico de Compostos de Paládio (II) ou Platina (II) e de Derivados do Ferroceno”, Orientador: Armando J. L. Pombeiro

3 TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS OU SUBMETIDOS EM REVISTAS INTERNACIONAIS

1. CASTILHO, T. J. ; POMBEIRO, A. J. L. ; BERTANI, R. ; MICHELIN, R. ; MOZZON, M. Electrochemical of some dinuclear carbene complexes of Pd or Pt. *Portugaliae Electrochimica Acta*, v. 9, p. 241, 1991.
2. BERTANI, R. ; MOZZON, M. ; MICHELIN, R. ; BERNETOLLO, F.; BOMBIERI, G. ; CASTILHO, T. J. ; POMBEIRO, A. J. L. Synthesis, chemical and electrochemical deprotonation reactions of aminocarbene

- complexes of palladium (II) and platinum (II). X – ray structure of $\{(PPh_3)ClPt[\mu-COCH_2CH_2N-C,N]\}$. *Inorganic Chimica Acta*, v. 189, p. 175, 1991.
3. SILVA, M. E. N. P. R. A ; POMBEIRO, A. J. L. ; SILVA, J. J. R. F. ; HERRMANN, R. ; DEUS, N. ; CASTILHO, T. J. ; SILVA, M. F. G. Redox potential and substituent effects at ferrocene derivatives : Estimates of Hammett ρ and Tafel polar α^* substituent constants. *J. of Organometallic Chemistry*, v. 421, p. 75, 1991.
 4. BERTANI, R. ; MOZZON, M. ; MICHELIN, R. ; CASTILHO, T. J. ; POMBEIRO, A. J. L. Reactions with nucleophiles and cathodic electrochemical behaviour of some neutral and cationic diamino-, dioxy-, and aminooxycarbene complexes of palladium (II) and platinum (II). *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 431, p. 117, 1992.
 5. CASTILHO, T. J. ; SILVA, M. F. G. ; POMBEIRO, A. J. L.; BERTANI, R. ; MOZZON, M. ; MICHELIN, R. Electrochemical behaviour of aminooxy-, dioxy- and diaminocarbene complexes of palladium (II) and platinum (II). In: POMBEIRO, A. J. L. ; MCCLEVERTY, A. *Molecular electrochemistry of inorganic, bioinorganic and organometallic compounds*. Kluwer Academic Publishers, 1993. 345.
 6. NOGAMI, E. M. ; KIMURA, C. C. M.; MALAGUTI, A. R.; GALLI, D.; CASTILHO, T. J. ; RODRIGUES, C. ; NOZAKI, J. Recovery of protein from chrome shavings and application as a food supplement for tilapia *oreochromis niloticu*. *Journal of the American Leather Chemists Association*, v. 95, p. 119, 2000.
 7. CASTILHO, T. J. ; SOTOMAYOR, M. P. T. ; KUBOTA, L. T. Amperometric biosensor based on HRP for biogenic amine determinations in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003. Submetido.

4 TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. BERTANI, R. ; MOZZON, M.; MICHELIN, R. ; CASTILHO, T. J.; Pombeiro, A. J. L. Redox properties of carbene complexes of palladium (II) and platinum (II), J. Heyrovsky Cennial Congress on Polarography, Th-79, 1990, Prague, Czechoslovakia.
2. CASTILHO, T. J. ; POMBEIRO, A. J. L. ; BERTANI, R. ; MOZZON, M. ; MICHELIN, R. Electrochemical behaviour of some dinuclear carbene complexes of Pd or Pt. In: ENCONTRO DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE ELECTROQUÍMICA, 5.,1991, Aveiro, Portugal.

3. CASTILHO, T. J. ; SILVA, M. F. G. ; POMBEIRO, A. J. L. ; BERTANI, R. ; MOZZON, M. ; MICHELIN, R. Electrochemical behaviour of aminoxy-, dioxy- and diaminocarbene complexes of palladium (II) and platinum (II). *Molecular Electrochemistry of Inorganic, Bioinorganic and Organometallic Compounds*, 1992, Sintra, Portugal.
4. LENZI, E., LUCHESE, E. B., CASTILHO, T. J., GALLI, D. Concentração de mercúrio em peixes coletados na Palnicie de inundação do Rio Paraná – Região de Porto Rico – Paraná – Brasil. In: 4º Encontro Nacional de Estudos sobre o Meio Ambiente, UFMT, 1993, Cuiabá – Mato Grosso.
5. LENZI, E. ; LUCHESE, E. B. ; CASTILHO, T. J. ; MORAES, L. A. F. ; GALLI, D. Preliminary results of total mercury concentrations in *p. scrofa* (steidachner) and *p. corruscans* (agassiz) from tree sites of Parana river system, Porto Rico área, PR, Brazil. In: SIL INTERNATIONAL CONGRESS, 26., 1995, São Paulo.
6. CASTILHO, T. J. ; ROSATTO, S. S. ; KUBOTA, L. T. Influência das condições de imobilização de peroxidase em grafite na performance de biossensor para serotonina. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ELETROQUÍMICA E ELETROANALÍTICA, 12., 2001, Gramado, Rio Grande do Sul.
7. CASTILHO, T. J. ; KUBOTA, L. T. Avaliação de um biossensor para serotonina a base de peroxidase em pasta de carbono. In: ENQA – ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 11., 2001. Campinas, São Paulo.

5 ATIVIDADES DOCENTES

1. Professora em Escola Particular – 1976 a 1984.
2. Professora da Rede Estadual de Ensino do Paraná – 1984 a 1996.
3. Professora contratada da Universidade Estadual de Maringá – 1981.
4. Professora contratada da Universidade Estadual de Maringá – 1995.
5. Professora efetiva da Universidade Estadual de Maringá desde 28/2/1996.

6 OUTRAS ATIVIDADES

1. Técnica de laboratório do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá – 1979 a 1980.
2. Integrante do grupo de pesquisa em eletroquímica em Portugal, com bolsa do Programa de Mobilização em Ciências e Tecnologia da Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT) de 11/90 a 10/91.

RESUMO

“DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO À BASE DE PEROXIDASE PARA DETERMINAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES”

Autora: Tânia Jacometo de Castilho

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Sendo os neurotransmissores compostos que desempenham papel importante no organismo humano, a análise dos mesmos é revestida de um interesse especial nas áreas médica e farmacêutica. A análise de neurotransmissores, utilizando um biossensor à base de peroxidase (HRP) imobilizada em pasta de carbono, pode ser uma alternativa às técnicas tradicionais de análise que são pouco seletivas (fluorimétrica), muito caras (CG-MS) ou demoradas (HPLC-ED). Estes fatores as tornam pouco adequadas para análises rápidas. Assim, esta tese refere-se ao desenvolvimento de um biossensor à base de peroxidase imobilizada em pasta de carbono para a determinação de neurotransmissores em amostras biológicas. Na construção do biossensor foram realizados oito procedimentos diferentes para imobilizar a enzima HRP e todas as condições experimentais determinadas, usando uma solução do neurotransmissor serotonina como composto de referência. Foram avaliados os valores de sensibilidade obtidos com a adição de glutaraldeído, albumina de soro bovino e a ativação da grafite com carbodiimida no processo de imobilização enzimática. Os resultados indicaram que a composição da pasta tem grande influência na atividade da enzima imobilizada para catalisar a oxidação da serotonina. Os melhores resultados foram obtidos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,0$), contendo $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio, aplicando-se o potencial -50 mV vs ECS . Nestas condições, o biossensor apresentou resposta linear entre $0,2$ e $2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, limite de detecção de $0,08 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e tempo de resposta de $0,5 \text{ s}$. O biossensor apresentou sensibilidades semelhantes para a dopamina, a epinefrina e a norepinefrina. Para a serotonina a sensibilidade foi mais baixa, estando de acordo com o potencial redox mais elevado e ser esta substância um monofenol. O sensor proposto apresentou-se estável durante quatro horas de monitoramento, e uma diferença de resposta de 2% entre seis preparações. O biossensor foi aplicado com sucesso na determinação da concentração total de neurotransmissores em amostra de plasma sanguíneo de rato, sendo obtida uma recuperação de 102% .

Palavras - chaves: neurotransmissores, serotonina, biossensor amperométrico, horseradish peroxidase.

ABSTRACT

“DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A PEROXIDASE BASED AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR THE NEUROTRANSMITTERS DETERMINATION”

Author: Tânia Jacometo de Castilho

Supervisor: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Neurotransmitters are compounds that have a very important role on human body and their analysis have an especial interest to medical and pharmacological areas. This type of analysis using a biosensor with HRP enzyme immobilized on carbon paste might be an interesting alternative to the traditional methods that are low selective (fluorimetric), very expensive (GC-MS), or takes much time to accomplish the results (HPLC-ED). The characteristics mentioned above make them non appropriate for quick analysis. Thus, this work describes the biosensor development and its use for determination of neurotransmitter in biological samples. Eight different protocols on the HRP enzyme immobilization were used and optimal experimental conditions were determined using a serotonin solution as a standard. Values of sensitivity were evaluated by adding glutaraldehyde, bovine serum albumin, and carbodiimide to the enzyme immobilization process. The results showed that the paste composition has great influence on the enzyme activity for serotonin oxidation. The best results were obtained in 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer (pH=7.0) containing $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ of hydrogen peroxide at an applied potential of -50 mV vs SCE . On these conditions, the biosensor showed a linear response range from 0.2 to $2.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, a detection limit of $0.08 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ and the response time was 0.5 seconds. The biosensor sensitivities for dopamine, epinephrine and norepinephrine were practically the same. For serotonin, the biosensor showed a slight lower sensitivity, what agrees with its redox potential. The proposed biosensor presented a stable response during 4 h under continuous monitoring. The difference of response was of 2% among six different preparations. The biosensor showed a successful use on the determination of the total fraction of neurotransmitters in rat blood samples, obtaining an average recovery of 102%.

Keywords: neurotransmitter, serotonin, amperometric biosensor, horseradish peroxidase.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

1 APRESENTAÇÃO 1

CAPÍTULO II

2 NEUROTRANSMISSORES 5

2.1 GENERALIDADES 5

2.2 SEROTONINA 6

2.3 NOREPINEFRINA 7

2.4 DOPAMINA 9

2.5 EPINEFRINA 10

**3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE
NEUROTRANSMISSORES 11**

3.1 MÉTODOS NÃO ELETROQUÍMICOS 11

3.2 MÉTODOS ELETROQUÍMICOS 13

CAPÍTULO III

4 BIOSSENSORES 17

4.1 INTRODUÇÃO 17

5 ENZIMAS 22

5.1 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS 24

5.1.1 Imobilização por Adsorção 25

5.1.2 Imobilização por Oclusão 26

5.1.3 Imobilização por Ligação Covalente Cruzada 26

5.1.4 Imobilização por Ligação Covalente 27

5.1.5 Imobilização por Encapsulação 28

6	BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS	28
6.1	EFEITO DE ADITIVOS NA SENSIBILIDADE E ESTABILIDADE DE BIOSSENSORES	33
7	BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	34
8	BIOSSENSORES PARA NEUROTRANSMISSORES	37
9	BIOSSENSORES À BASE DE PEROXIDASE	40
CAPÍTULO IV		
10	OBJETIVOS	47
10.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
CAPÍTULO V		
11	METODOLOGIA	49
11.1	REAGENTES E MATERIAIS	49
11.2	CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR	50
11.2.1	Imobilização da Enzima na Grafite sem Carbodiimida	50
11.2.2	Imobilização da Enzima na Grafite via Carbodiimida	51
11.3	MEDIDAS AMPEROMÉTRICAS	52
11.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DO BIOSSENSOR	53
11.5	RESPOSTA PARA DIFERENTES NEUROTRANSMISSORES	54
11.6	EFEITO DE ADITIVOS NA PASTA	54
11.7	ESTUDO DE INTERFERENTES	55
11.8	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS	55
11.8.1	Recolha das Amostras	56
CAPÍTULO VI		
12	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
12.1	INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO DA HRP	

	NA RESPOSTA DO BIOSENSOR	57
12.2	QUANTIDADE DE ENZIMA NA PASTA	61
12.3	QUANTIDADE DE GLUTARALDEÍDO	63
12.4	QUANTIDADE DE ALBUMINA DE SORO BOVINO	64
12.5	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	66
12.6	EFEITO DO pH DA SOLUÇÃO TAMPÃO	67
12.7	EFEITO DO POTENCIAL APLICADO	69
12.8	INFLUÊNCIA DA SOLUÇÃO TAMPÃO	70
12.9	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO	71
12.10	CARACTERÍSTICAS DO SENSOR	72
12.10.1	Curva Analítica para Serotonina	73
12.10.2	Constante de Michaelis – Menten	73
12.10.3	Tempo de Resposta	74
12.10.4	Repetibilidade na Construção dos Sensores	74
12.11	ESTUDO DE DIFERENTES NEUROTRANSMISSORES	75
12.12	ESTABILIDADE	77
12.13	EFEITO DE ADITIVOS NA SENSIBILIDADE E ESTABILIDADE DO BIOSENSOR.....	78
12.14	ESTUDO DE INTERFERENTES	80
12.15	AVALIAÇÃO DO BIOSENSOR EM AMOSTRA REAL	81
CAPÍTULO VII		
13	CONCLUSÕES	83
CAPÍTULO VIII		
14	PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	85
CAPÍTULO IX		
	REFERÊNCIAS	87

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5 – HT – serotonina
- AH[•] - espécies radicalares
- AH₂ – doadores de elétrons/prótons
- BSA – albumina de soro bovino
- CDI – 1-ciclohexil-3-2-(monolinoetil) carbodiimida meta-p-toluenosulfato
- CF – composto fenólico
- DA – dopamina
- E – epinefrina
- E_{apl} – potencial aplicado
- ECS – eletrodo de calomelano saturado
- E^o – potencial formal (V)
- E_{ox} – enzima oxidada
- EQM – eletrodo quimicamente modificado
- E_{red} – enzima reduzida
- GA – glutaraldeído
- GCDI – grafite ativada com carbodiimida
- Hepes – ácido N, 2-hidroxi-etil-piperazina-dietano sulfônico
- HRP – horseradish peroxidase
- j - densidade de corrente (A cm⁻²)
- NE – norepinefrina
- PEI – polietilenoimina
- PPO – polifenol oxidase
- PQQ – polipirrolquinolina quinona
- Pipes – ácido 1,4-piperazina-dietano sulfônico
- Tris – tris-hidroximetil-aminoetano
- Δj – densidade de corrente descontado o valor do branco

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Biossíntese da serotonina	7
FIGURA 2 - Biossíntese das catecolaminas.....	8
FIGURA 3 - Diagrama conceitual de um biossensor.....	18
FIGURA 4 - Biocomponentes e transdutores empregados na construção de biossensores.....	19
FIGURA 5 - Mecanismo de reações em eletrodos modificados por enzimas para a determinação de compostos fenólicos. E_{red} e E_{ox} são, respectivamente, as formas reduzida e oxidada das enzimas; CF = composto fenólico.....	36
FIGURA 6 - Estrutura da molécula protoporfirina de ferro.....	41
FIGURA 7 - Mecanismo de transferência de elétrons mediada em eletrodo de pasta de carbono. Catred e Catox são as formas reduzida e oxidada dos compostos catecólicos, respectivamente.....	44
FIGURA 8 - Esquema da reação via carbodiimida usada para a formação de ligação covalente entre a enzima e o suporte.....	59
FIGURA 9 - Ligação cruzada envolvendo a reação entre o glutaraldeído e grupos aminos residuais livres da enzima.....	60
FIGURA 10 - Imobilização de enzima e albumina de soro bovino via glutaraldeído.....	60
FIGURA 11 - Efeito da quantidade de HRP na sensibilidade do biossensor, obtida em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, $E_{apl} = -50 \text{ mV vs ECS}$, $10 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$	62
FIGURA 12 - Sensibilidade do biossensor em função das concentrações de peróxido, obtidas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, $E_{apl} = -50 \text{ mV vs ECS}$	67
FIGURA 13 - Resposta do biossensor em função do pH da solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, para $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de serotonina, $E_{apl} = -50 \text{ mV vs ECS}$ e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2	68

- FIGURA 14** - Resposta do biossensor em função do potencial aplicado obtida em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 para $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de serotonina, $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 70
- FIGURA 15** - Curva analítica obtida para serotonina usando o biossensor desenvolvido aplicando o potencial de -50 mV vs ECS , em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 com uma concentração de peróxido de $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ 73
- FIGURA 16** - Teste de estabilidade, realizado com uma concentração de $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de serotonina, aplicando um potencial de -50 mV vs ECS , em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e concentração de peróxido de $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ 78
- FIGURA 17** - Comparação das sensibilidades dos biossensores preparados sem e com o acréscimo de aditivos. Respostas obtidas nas mesmas condições mencionadas na Figura 15..... 78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Respostas dos biossensores à base de HRP na determinação de serotonina obtidas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0; $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 ; $E_{\text{apl}} = -50 \text{ vs ECS}$	58
TABELA 2 - Efeito das quantidades de glutaraldeído na pasta sobre a resposta do biossensor, para uma concentração $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de serotonina e $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 , em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0, $E_{\text{apl}} = -50 \text{ mV vs ECS}$	64
TABELA 3 - Efeito das quantidades de BSA na pasta sobre a resposta do biossensor, para uma concentração $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de serotonina, $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 , em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0, $E_{\text{apl}} = -50 \text{ mV vs ECS}$	65
TABELA 4 - Sensibilidade do biossensor em função do tipo de tampão utilizado, obtidas em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0. $E_{\text{apl}} = -50 \text{ mV vs ECS}$ e $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2	71
TABELA 5 - Valores de sensibilidade obtidos em diferentes concentrações de tampão fosfato pH 7,0, $E_{\text{apl}} = -50 \text{ mV vs ECS}$ e $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2	72
TABELA 6 - Sensibilidades obtidas para seis biossensores desenvolvidos, utilizados na caracterização do biossensor.....	75
TABELA 7 - Parâmetros analíticos para o biossensor desenvolvido na presença de diferentes neurotransmissores, obtidos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) $E_{\text{apl}} = -50 \text{ vs ECS}$	76
TABELA 8 - Valores de concentração de aminas biogênicas, determinados em amostras de soro sanguíneo de rato, obtidos com o biossensor proposto.....	81
TABELA 9 – Valores de recuperação, determinados em amostras de soro sanguíneos de rato, usando o biossensor proposto, com a adição de $0,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de serotonina como padrão	81

1 APRESENTAÇÃO

As áreas médica e farmacêutica possuem grande interesse no desenvolvimento de pesquisas que envolvam neurotransmissores, uma vez que estas substâncias são importantes tanto para o sistema nervoso central (SNC) como para o sistema nervoso periférico. Neurotransmissores (ou aminas biogênicas) como as catecolaminas – dopamina, epinefrina e norepinefrina – e as indolaminas, como a serotonina, são freqüentemente quantificados. Muitos métodos têm sido utilizados na determinação analítica destes compostos em formulações farmacêuticas, assim como em soro sanguíneo e urina (análises clínicas), incluindo os métodos fluorimétricos e cromatográficos, entre outros. Entretanto, estas técnicas não permitem um monitoramento adequado, pois são caras, lentas e necessitam de operadores bem treinados, o que dificulta a sua utilização em análises de rotina.

A necessidade de sistemas de análises mais versáteis tem estimulado a investigação científica. Nesta perspectiva, os biossensores mostram-se como uma alternativa viável, pois a construção de pequenos dispositivos que possam medir de forma específica um analito de interesse sem a interferência de outros compostos presentes na matriz, é altamente atrativa. A incorporação de moléculas com atividade biológica em metodologias analíticas vem aumentando sensivelmente nos últimos anos, obtendo sucesso nos mais variados procedimentos analíticos.

A indústria alimentícia tem interesse na avaliação da qualidade de seus produtos sendo, portanto, um campo atraente para o uso de procedimentos fáceis e eficientes na detecção de pesticidas, toxinas, controle de fermentações, etc. A proteção ambiental necessita de dispositivos analíticos simples no monitoramento de compostos poluentes, de modo que os sensores apresentam-se como uma

ferramenta útil também nesta área. As análises em tempo real de amostras clínicas são um dos segmentos que apresentam maior pujança para o estudo dos biossensores, pois existe interesse explícito para que as análises neste segmento sejam rápidas, precisas e que possam ser realizadas *in vivo*.

Um aspecto importante para o desenvolvimento de eletrodos para determinação eletroquímica de neurotransmissores como serotonina (5-HT), dopamina (DA), epinefrina (E) e norepinefrina (NE) é que estas substâncias estão relacionadas com graves doenças, que serão mencionadas no decorrer deste trabalho, de modo que a sua quantificação é importante para o diagnóstico, monitoramento e intervenção farmacológica.

Deste modo, uma alternativa para a determinação de neurotransmissores é a construção de um biossensor amperométrico com a imobilização da enzima horseradish peroxidase (HRP). A alta atividade catalítica das peroxidases com vários substratos faz com que este tipo de enzima seja bastante utilizado na construção de eletrodos amperométricos os quais, inicialmente, foram utilizados na determinação de peróxidos; atualmente são usados na análise de aminas aromáticas, espécies fenólicas e outros analitos.

Dando continuidade a uma das linhas de pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Eletroquímica e Eletroanalítica para o Desenvolvimento de Sensores (LEEDS), sob a coordenação do professor Dr. Lauro Tatsuo Kubota, esta tese descreve o desenvolvimento de um eletrodo, baseado na metodologia de biossensores, para a determinação de neurotransmissores e avalia o seu desempenho em análises de amostras biológicas. Os biossensores apresentam vantagens com relação aos métodos tradicionalmente utilizados por associar resposta rápida e seletiva, facilidade de análise e potencialidade para miniaturização. Assim, um estudo para a procura de uma opção ao que vem sendo aplicado, é ao mesmo tempo oportuno e relevante.

Para facilitar o entendimento do leitor, este trabalho foi dividido em capítulos, de modo que nos capítulos II e III são apresentados aspectos teóricos como a importância dos neurotransmissores e os principais métodos utilizados para a sua determinação. São ainda apresentados alguns fundamentos básicos dos biossensores, assim como os princípios de operação dos biossensores amperométricos. Em seguida, discorre-se sobre biossensores para neurotransmissores e também sobre biossensores à base de peroxidase. No capítulo IV estão os objetivos deste trabalho. Nos capítulos de V a VIII são apresentados o detalhamento experimental, a discussão dos resultados obtidos, as conclusões mais relevantes e as propostas para trabalhos futuros. Finalmente, no capítulo IX estão as referências citadas no decorrer da tese.

2 NEUROTRANSMISSORES

2.1 GENERALIDADES

A partir da década de 90 houve uma mudança radical no modo de pensar sobre a atuação dos neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC). Primeiramente, é preciso considerar que a quantidade de transmissores saltou de aproximadamente dez considerados “clássicos” (principalmente pequenas monoaminas e aminoácidos), para quarenta ou mais, contribuindo para tal a descoberta de uma grande quantidade de neuropeptídeos.

O segundo ponto a considerar é que, originalmente, uma substância para ser considerada neurotransmissor devia ser encontrada no espaço sináptico – região microscópica entre o terminal de um neurônio e a superfície receptora de outro – e apresentar ação pós-sináptica. Ou seja, nas sinapses, a chegada de um impulso nervoso deveria causar uma rápida liberação de moléculas de neurotransmissores que se difundiam, de forma breve, sobre a membrana de um neurônio adjacente, aumentando ou diminuindo a sua atividade elétrica (VALLE et al., 1991). Entretanto, atualmente é sabido que os mediadores químicos dentro do cérebro podem ter ações lentas e de longa duração (durante minutos ou horas), ter um efeito pulverizador e agirem a uma distância considerável de seu local de ação (RANG et al., 1997).

Nos últimos anos, foram obtidos progressos valiosos na caracterização de neurotransmissores, sua localização e elucidação dos eventos moleculares que os envolvem. A quantificação destas substâncias no tecido cerebral e nos fluidos extra-celulares vem sendo usada para desenvolver estratégias no tratamento de doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas e em seus diagnósticos. A seguir

são apresentadas as principais características dos neurotransmissores estudados nesta tese: a serotonina e as catecolaminas – dopamina, epinefrina e norepinefrina.

2.2 SEROTONINA

A serotonina é um neurotransmissor derivado do triptofano e, nos mamíferos, é sintetizada no cérebro e em outros tecidos como, por exemplo, no fígado. A mesma está largamente distribuída na natureza, sendo encontrada na maioria dos vertebrados e invertebrados, no veneno de vespas e escorpiões, e em vários frutos, tais como abacate, banana, berinjela, maracujá, tomate, abacaxi e outros (ZANINI ; OGA, 1994). É uma monoamina reguladora do organismo, fisiologicamente ativa, que juntamente com a dopamina, a epinefrina e a noradrenalina forma o grupo denominado aminas biogênicas. Na sua biossíntese, primeiro o triptofano sofre uma hidroxilação pela ação da triptofano hidroxilase, formando o 5 – hidroxitriptofano, que sofre então uma descarboxilação formando a serotonina (Figura 1). É também conhecida por 5 – HT ou 5–hidroxitriptamina.

Os neurotransmissores podem ser inibitórios ou excitatórios, sendo a serotonina um neurotransmissor excitatório. No sistema nervoso central, ela está relacionada com a temperatura corporal, percepção sensorial, sono e controle hormonal. Interfere na fisiopatologia de desordens afetivas, estados hiperagressivos e na depressão. Foi sugerida sua participação também nas disfunções mentais, principalmente a esquizofrenia (ZANINI ; OGA, 1994 ; VALLE et al., 1991). Em estudos sobre o envelhecimento humano, a serotonina tem sido estudada em conjunto com os demais neurotransmissores nas funções da memória, pensamento, emoção e comportamento. Uma das explicações para a depressão é o abaixamento no nível de serotonina, que resulta em um humor deprimido (COHEN, 1995).

Os níveis normais de serotonina no organismo estão entre 0,5 – 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Valores acima destes podem indicar a presença de carcinomas. Estes tumores secretam grandes quantidades de serotonina e produzem manchas cutâneas por vasodilatação.

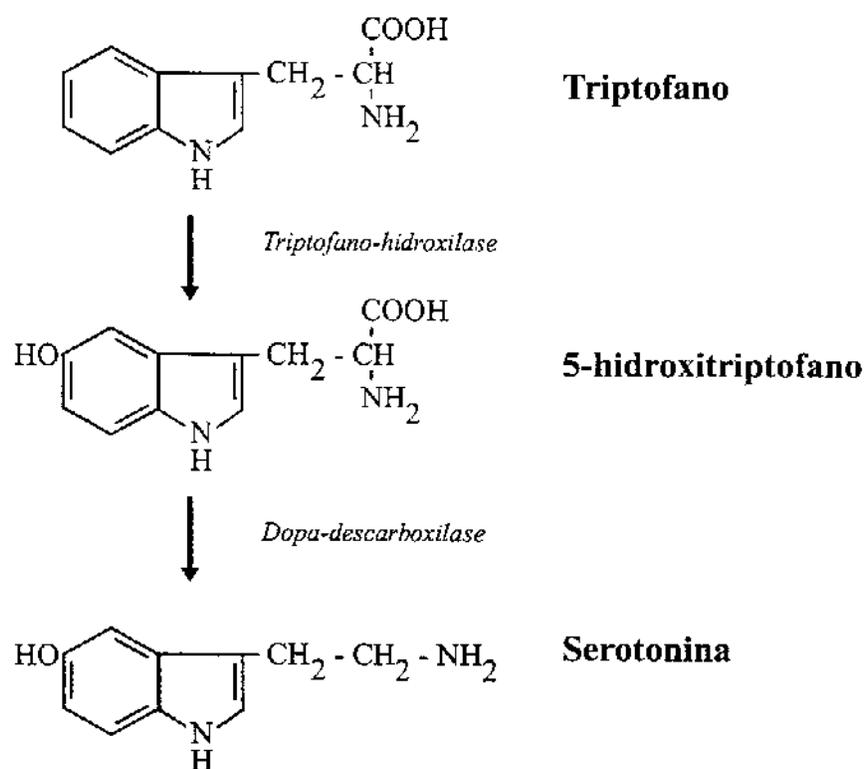


Figura 1 - Biossíntese da serotonina

2.3 NOREPINEFRINA

A norepinefrina, ou noradrenalina, é um neurotransmissor do sistema

nervoso autônomo simpático e do sistema nervoso central. No SNC, encontra-se no córtex cerebral, sistema límbico, hipotálamo, cerebelo e medula espinhal. A sua biossíntese (Figura 2) é feita a partir do aminoácido tirosina captado pelo terminal nervoso (RANG et al., 1995). A maior parte da norepinefrina encontrada em terminações nervosas fica contida em pequenas vesículas situadas nos axônios dos neurônios e apenas uma pequena parte permanece, em condições normais, livre no citoplasma.

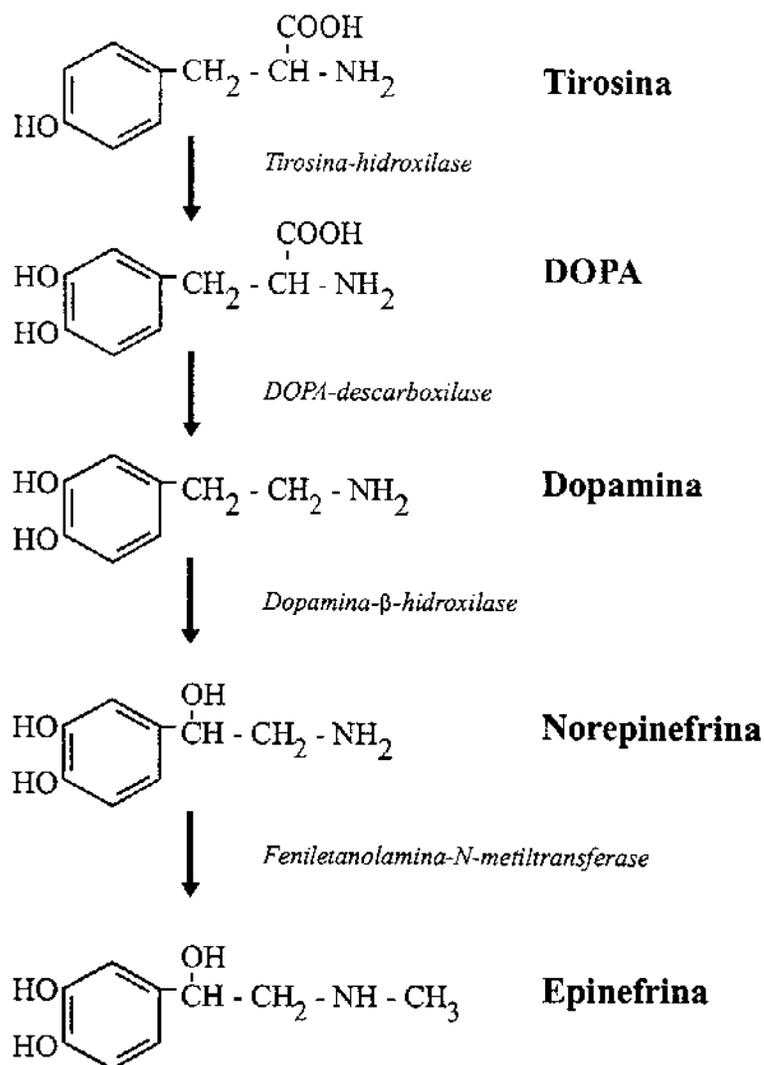


Figura 2 - Biossíntese das catecolaminas

A norepinefrina interfere no ritmo sono/vigília, emoção, aprendizagem, regulação da temperatura, etc (ZANINI ; OGA, 1994 ; VALLE et al., 1991). A sua concentração normal no plasma sanguíneo em adultos, é entre 0,3 – 1,7 nmol L⁻¹. Alterações neste nível de concentração levam a diversos distúrbios, entre eles a depressão (CALBREATH, 1992).

A hipótese da catecolamina dos distúrbios afetivos, originalmente formulada por Schildkrant, em 1965, sugere que a depressão resulta de uma deficiência funcional da norepinefrina em determinadas áreas do cérebro, enquanto a mania resulta de um excesso (RANG et al., 1995).

2.4 DOPAMINA

A avaliação do papel da dopamina no cérebro, como um neurotransmissor efetivo e não meramente como precursor da norepinefrina, ocorreu em meados da década de 60, uma notável década de progresso, denominada os “anos das monoaminas”, quando uma combinação da neuroquímica e neurofarmacologia levou a muitas descobertas importantes sobre o papel dos neurotransmissores no SNC e sobre a capacidade de certas drogas influenciar nesses sistemas.

A síntese da dopamina segue a mesma via que a norepinefrina, isto é, a conversão da tirosina em dopa seguida de descarboxilação (Figura 2). É encontrada no sistema límbico, hipotálamo, etc e as suas funções, de modo geral, dividem-se em: (i) controle motor (sistema nigrostriatal, responsável por 75% da dopamina do cérebro); (ii) efeitos comportamentais; (iii) controle endócrino. Sua concentração no plasma sanguíneo é menor que 0,7 nmol L⁻¹ (CALBREATH, 1992).

Entre os males relacionados com a dopamina está a doença de Parkinson, que é um distúrbio motor progressivo, ocorrendo com maior frequência em pacientes

idosos, cujos principais sintomas são a rigidez e o tremor, associado a uma extrema lentidão para iniciar movimentos voluntários (hipocinesia). É sabido que o mal de Parkinson está associado a uma deficiência de dopamina nas vias nigrostriatais.

Em 1965, foi proposta a “teoria da dopamina” sugerindo que uma concentração alta de dopamina no cérebro é responsável pelos delírios e alucinações característicos de portadores de esquizofrenia (RANG et al., 1995).

2.5 EPINEFRINA

A epinefrina é uma catecolamina liberada pela medula supra-renal. Na sua biossíntese (Figura 2), a feniletanolamina-N-metiltransferase catalisa a N-metilação da norepinefrina em epinefrina. A principal localização desta enzima é a medula supra-renal, que contém células liberadoras de epinefrina separadas das células liberadoras de norepinefrina. Em um adulto, a sua concentração normal no plasma sanguíneo é menor que $0,5 \text{ nmol L}^{-1}$ (CALBREATH, 1992). A estimulação das medulas supra-renais pelos nervos simpáticos tem como consequência a liberação de grandes quantidades de epinefrina que passa ao sangue circulante e é levada a todos os tecidos do corpo.

Durante períodos de estresse, quando o sistema nervoso simpático é excitado, a epinefrina secretada pela medula supra-renal causa um grande aumento tanto na glicemia quanto na concentração sanguínea de ácidos graxos. Quantitativamente, o aumento de ácidos graxos é muito maior que o aumento da glicemia. Por conseguinte, a epinefrina aumenta especialmente a utilização da gordura em estados de estresse como os exercícios físicos, o choque circulatório, a ansiedade e assim por diante. Uma outra propriedade da epinefrina é aumentar a atividade cardíaca e causar ligeira constrição dos vasos sanguíneos dos músculos. Porém, como os vasos musculares

representam uma parte considerável de todos os vasos do corpo, a epinefrina eleva a pressão arterial, mas eleva muito mais o débito cardíaco, pela ação que exerce sobre o coração e as veias (GUYTON, 1986).

3 MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES

3.1 MÉTODOS NÃO ELETROQUÍMICOS

Sendo os neurotransmissores compostos que possuem papel importante no sistema nervoso, pois são as chaves de ligação entre os neurônios, a análise dos mesmos é revestida de um interesse especial em neurociência, uma vez que drogas como anfetamina e cocaína possuem seus sítios de ação no cérebro onde esses neurotransmissores atuam.

Pesquisas médicas e farmacêuticas têm se voltado para este campo, com o objetivo de esclarecer os mecanismos de muitas doenças, de modo que seja possível uma intervenção farmacológica. Assim, muitas técnicas estão sendo desenvolvidas e aperfeiçoadas de forma a permitir a detecção e quantificação de neurotransmissores, como os que são objeto de estudo nesta tese, em fluidos biológicos e tecidos nervosos.

Neurotransmissores, como as catecolaminas, podem ser determinados utilizando-se a eletroforese capilar (CHEN et al., 2001 ; MARUSZAK et al., 2001). Esta é uma técnica barata, instrumentalmente simples, além de necessitar de um volume pequeno de amostra e consumir pouco solvente. Contudo, o seu uso em análise de traço está condicionado ao acoplamento de um sistema de detecção eletroquímico ou de fluorescência, devido à falta de sensibilidade ocasionada por volumes pequenos de amostra.

Métodos espectrofluorimétricos, baseados na fluorescência das catecolaminas, também têm sido usados na análise de epinefrina em amostra sintética (PALOP et al., 2002) e de dopamina em amostra de urina (WANG et al., 2002). A oxidação de soluções aquosas de epinefrina e norepinefrina pelo oxigênio, em meio básico, e o uso de solvente orgânico (no caso, metanol) para determinação de dopamina provocam um aumento na intensidade da fluorescência destas substâncias. Assim, estes neurotransmissores puderam ser determinados e os resultados encontrados para a dopamina estão de acordo com os valores obtidos por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), recomendada pela Farmacopéia Britânica. Os métodos baseados em fluorescência são geralmente mais sensíveis do que aqueles baseados em absorção de radiação. Isto acontece porque a intensidade da fluorescência pode ser aumentada, através do aumento da potência do feixe de excitação de uma espécie ou através de um evento químico, como nos exemplos citados acima.

Entre as mais variadas metodologias para a determinação de neurotransmissores, a HPLC é uma das mais amplamente empregadas devido à sua versatilidade, sensibilidade e especificidade. Devido à baixa concentração com que estes compostos estão presentes, o sistema de detecção deve ser muito sensível e específico, de modo que na maioria das investigações é usada a detecção fluorimétrica (PANHOLZER et al., 1999 ; CHAN et al., 2000 ; FOTOPOULOU ; IOANNOU, 2002) ou a detecção eletroquímica (TSAI ; CHEN, 1996 ; RAGGI et al., 1999 ; XU et al., 2001 ; MCKENZIE et al., 2002).

A detecção fluorimétrica, alicerçada no uso de uma pré ou pós-coluna de separação, constitui um sistema de detecção seletivo e fácil de operar. O uso deste sistema para determinação de epinefrina, norepinefrina, dopamina e serotonina baseia-se na reatividade de suas aminas primárias com reagentes fluorescentes ou a oxidação dos grupos catecólicos seguida da reação com reagentes fluorescentes. É preciso considerar, no entanto, que a epinefrina não possui em sua estrutura uma

amina primária, o que impõe uma dificuldade ao uso do método, embora isto possa ser contornado.

As catecolaminas e indolaminas são espécies naturalmente eletroativas e podem ser avaliadas por detectores amperométricos ou coulométricos, sendo os amperométricos os mais comumente empregados.

De modo geral, estes métodos necessitam de pré-tratamento da amostra e são lentos, o que os torna inadequados para análise de rotina (GROSSI et al., 1990), dificultando a sua aplicação para diagnósticos rápidos. Assim, o desenvolvimento de uma metodologia fácil, sensível, eficiente e de baixo custo, para análise de neurotransmissores, é extremamente importante.

3.2 MÉTODOS ELETROQUÍMICOS

Os métodos eletroquímicos se destacam pela sensibilidade, exatidão e simplicidade além de possuírem uma vasta área de aplicação, incluindo monitoramento ambiental, controle de qualidade industrial, medicina e biotecnologia.

A determinação de neurotransmissores pode ser feita fazendo-se uso de eletrodos quimicamente modificados (EQM). Este termo foi introduzido por Murray et al., em 1975, para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, deliberadamente imobilizadas em suas superfícies, com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução. A modificação da superfície do eletrodo, de forma a impor e controlar sua reatividade e/ou seletividade, possibilita o desenvolvimento de eletrodos para variados propósitos. A grande maioria das aplicações analíticas de EQMs envolve técnicas

voltamétricas ou amperométricas, embora existam também descritos na literatura casos de EQMs como eletrodos íons seletivos.

Assim, para melhor compreensão do mecanismo de funcionamento do cérebro, especialmente dos mamíferos, a neurociência tem realizado diversos estudos sobre os neurotransmissores e uma contribuição efetiva tem sido a utilização de eletrodos de fibra de carbono, implantados diretamente em cérebros de ratos (CRESPI et al., 1992 , 1993). Devido às suas pequenas dimensões, as fibras de carbono têm-se mostrado um excelente material para a construção de microeletrodos, e características como baixa queda ôhmica, corrente capacitiva pequena, facilidade de alcançar o estado estacionário e possibilidade de usar voltametria a altas velocidades são apontadas como responsáveis pelo uso das mesmas em medidas eletroquímicas. Jackson et al. (1995) determinaram dopamina e serotonina utilizando microeletrodos de fibra de carbono recobertos com Nafion®, utilizando a técnica de voltametria cíclica a alta velocidade. Os eletrodos foram usados para monitorar o aumento de dopamina e serotonina, em ratos anestesiados, como resposta a um estímulo elétrico. O Nafion® atuou como um “filtro químico” prevenindo o acesso ao eletrodo de espécies aniônicas e ao mesmo tempo facilitou o acesso de aminas, como a serotonina. Além disso, quando usado com a técnica de voltametria cíclica a alta velocidade, o Nafion® restringe a difusão do analito para o interior do filme, de modo que as medidas obtidas *in vivo* podem ser convertidas em concentração, tendo como base a curva de calibração.

A norepinefrina, a dopamina e a serotonina foram estudadas por voltametria. O estudo da norepinefrina foi feito usando-se um eletrodo de ouro recoberto com um filme de complexo de fulereno/Nafion® (WEI et al., 2002). Os resultados indicaram que o complexo utilizado pôde promover a oxidação da norepinefrina. Este fato fortalece a possibilidade deste eletrodo ser usado em aplicações futuras. A serotonina e a dopamina foram determinadas empregando um eletrodo de grafite reforçado por

carbono (GRC), projetado por Miyazaki et al., 1999. Os resultados mostraram que o método não é vantajoso somente para a determinação simultânea dos dois neurotransmissores citados, bem como na determinação de cada um. O principal objetivo do desenvolvimento do eletrodo GRC é a sua aplicação no estudo de neurotransmissores *in vivo*.

A modificação do eletrodo de carbono vítreo também é uma realidade na determinação de neurotransmissores. A determinação voltamétrica de serotonina foi feita por Zen et al. (1998), em sangue humano, recobrando um eletrodo de carbono vítreo com Nafion®/óxido de rutênio. Este eletrodo apresentou boa seletividade e sensibilidade assim como tempo de resposta mais rápido, quando comparado com eletrodo de carbono vítreo não modificado, sugerindo que esta metodologia pode ser útil no monitoramento de serotonina *in vivo*. A concentração de serotonina determinada neste estudo foi de $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$. Fazendo uso também de um eletrodo de carbono vítreo modificado, Rubianes e Rivas (2001) quantificaram dopamina. A modificação foi feita com um polímero obtido pela polimerização de L-dopa. O filme polimérico obtido apresentou uma grande capacidade de excluir espécies aniônicas, como ácido ascórbico e ácido úrico. Espécies catiônicas como epinefrina, norepinefrina e dopamina foram oxidadas no eletrodo modificado e então quantificadas.

Os eletrodos de pasta de carbono são versáteis, apresentam baixa corrente de fundo, baixo custo, facilidade de renovação da superfície e, se modificados de maneira conveniente, podem ser usados na determinação eletroanalítica de neurotransmissores. Portanto, eletrodos de pasta de carbono modificados com ftalocianinas de ferro ou cobre surgem como alternativas na detecção dessas substâncias (ONI ; NYOKONG, 2001 ; SOTOMAYOR et al., 2002). Este tipo de modificação tem por objetivo obter uma transferência de elétrons mais eficiente entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo, imprimindo uma maior

robustez ao eletrodo. A transferência de elétrons ineficiente é causada pela densa camada de proteína em volta do sítio ativo da enzima, o que provoca uma barreira para a transferência de elétrons. A principal característica desse eletrodo é o uso de um complexo de ferro ou de cobre que imita o sítio ativo de uma enzima e com isso pode ser usado para catalisar reações redoxes de analitos extremamente importantes, como as catecolaminas e a serotonina.

A determinação de neurotransmissores também pode ser realizada utilizando-se biossensores. Uma revisão bibliográfica mais específica está apresentada no capítulo III, já que o assunto tem ligação direta com a proposta deste trabalho, que é desenvolver um biossensor amperométrico para neurotransmissores.

4 BIOSSENSORES

4.1 INTRODUÇÃO

Sensor químico é um dispositivo que transforma a informação química em um sinal analiticamente útil. De modo geral um sensor químico possui três elementos básicos: *(i)* a fase sensora ou de reconhecimento, em que ocorre a interação seletiva com o analito; *(ii)* o transdutor, que tem a propriedade de converter a grandeza físico-química em um sinal mensurável; *(iii)* o instrumento, que trata o sinal e executa os cálculos (FOGT, 1990). Dependendo da natureza física do sinal, os sensores químicos podem ser classificados em eletromagnético, elétrico ou térmico. Uma classificação adicional pode ainda ser feita. No caso em que o sinal é elétrico, o sensor pode ser amperométrico, potenciométrico ou condutimétrico (CUNNINGHAM, 1998).

Nas três últimas décadas um novo conceito de sensor, denominado biossensor, tem feito parte da literatura científica. Biossensores são sensores químicos que fornecem informação analítica quantitativa ou semiquantitativa, usando um elemento biológico reconhecedor incorporado a um transdutor que deve ser capaz de converter a resposta química em um sinal apropriado (VO-DINH ; CULLUM, 2000 ; THEVENOT et al. 2001). O elemento chave do biossensor é a camada sensora, constituída por biomoléculas, que permite avaliar a concentração do componente (bio)químico contido na amostra (SCOUTEN et al., 1995). O conceito de biossensor pode ser representado de acordo com a Figura 3. A escolha do material biológico e do transdutor adequado depende de cada amostra e do tipo de medida em que se tem interesse. O biocomponente determina o grau de seletividade ou especificidade do biossensor. O reconhecimento molecular seletivo

é a principal meta da tecnologia dos biossensores. Diferentes materiais e transdutores têm sido empregados na construção dos biossensores sendo os eletroquímicos (potenciométricos e amperométricos) os mais populares, pois apresentam respostas rápidas, possuem a vantagem de serem econômicos e a possibilidade de automação, permitindo sua aplicação em um amplo número de amostras (GUARDIA, 1995 ; ALEGRET, 1996 ; LUONG, 1988).

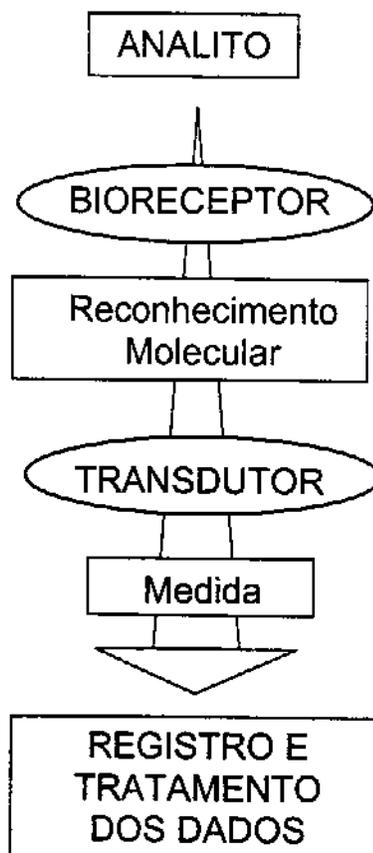


Figura 3 - Diagrama conceitual de um biossensor

O sensor amperométrico é mais rápido, mais sensível e mais preciso que o sensor potenciométrico. Isto acontece porque não existe a necessidade de esperar

que o equilíbrio termodinâmico seja atingido e a resposta é linear em função da concentração do analito. Contudo, a seletividade de um sensor amperométrico é governada somente pelo potencial redox do composto eletroativo presente e conseqüentemente, a corrente medida pode incluir a contribuição de muitas

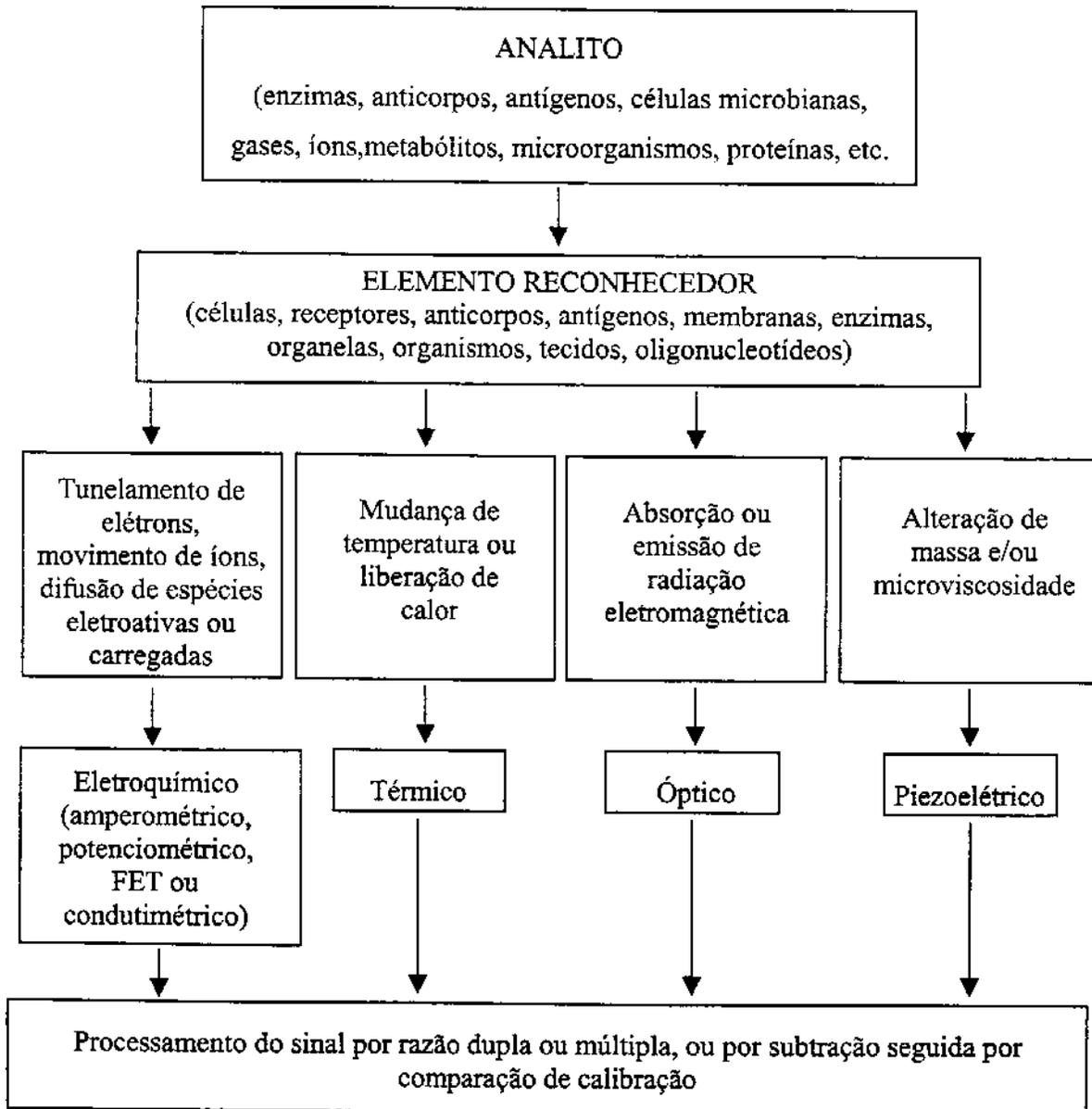


Figura 4 - Biocomponentes e transdutores empregados na construção de biossensores (MELLO ; KUBOTA, 2002)

espécies além daquela de interesse. Na Figura 4 são apresentados, alguns analitos (substratos) que são analisados immobilizando o componente biológico, separadamente, em diferentes transdutores uma vez que os biossensores podem ser classificados de acordo com o tipo de componente biológico envolvido no mecanismo, no modo de transdução ou na combinação destes dois aspectos.

Existe um consenso em relação às propriedades que biossensor ideal deve possuir. Além das características que os métodos analíticos devem ter, como exatidão, precisão, sensibilidade e seletividade, é desejável que os biossensores possuam propriedades adicionais, como ausência de histerese, estabilidade, robustez e baixo custo de produção em massa. Para proporcionar uma ampla aplicabilidade dos biossensores em trabalhos analíticos, é recomendável também que sejam portáteis e biocompatíveis, de forma que possam ser utilizados em avaliações *in situ* e *in vivo*. Assim sendo, é possível que sejam obtidas informações em tempo real.

A capacidade de determinação seletiva de analitos em amostras complexas, a rapidez de análise, a diminuição de custo e de resíduos gerados por análise, tem atraído o interesse de diferentes áreas como Medicina, Meio Ambiente, Alimentícia e da Biotecnologia. A maior motivação é a possibilidade de monitoramento contínuo *in vivo* ou *on line*. As características dos biossensores são vantajosas em relação aos eletrodos convencionais e técnicas off-line que utilizam HPLC ou espectroscopia de massa, uma vez que as técnicas convencionais requerem preparação da amostra, equipamentos caros e um longo tempo de processamento.

Na década de 60 surgiu o primeiro biossensor, desenvolvido por Updike e Hicks, utilizando a enzima glicose oxidase immobilizada em uma membrana de acrilamida (UPDIKE ; HICKS, 1967). O consumo de oxigênio foi detectado através da aplicação de um potencial suficiente para que houvesse a redução do mesmo na superfície de um eletrodo de Pt. O sistema de resposta quantificava a

variação de concentração de oxigênio dissolvido, que por sua vez era proporcional à concentração de glicose. Desde então diferentes biossensores têm sido desenvolvidos, pois em princípio, qualquer componente biológico pode ser combinado com um transdutor para produzir um biossensor operacional. Para avaliar o custo de um biossensor, é conveniente indicar o procedimento de imobilização e a quantidade de bioreceptor necessária para realizar um determinado número de ensaios.

Para Ivnitski et al. (1999), existem diferentes mercados que podem aproveitar as vantagens dos biossensores, se convenientemente sensíveis e exatos, considerando que possuem grande aplicação, como já foi citado anteriormente, em diagnósticos clínicos, controle de qualidade de alimentos, monitoramento ambiental e indústria militar. Entre todos estes, a área de diagnóstico clínico oferece oportunidade real para exploração de biossensores, a exemplo do biossensor para glicose que já é encontrado comercialmente e constitui uma importante ferramenta no monitoramento de glicose em indivíduos com diabetes.

Devido ao recente avanço nas áreas de microeletrônica, biotecnologia, fibras ópticas etc, a definição de um biossensor evoluiu do conceito clássico de um eletrodo associado a uma enzima, para uma variedade de métodos analíticos e dispositivos baseados em biocatálise ou bioafinidade (ROGERS ; WILLIANS, 1995 ; MASCINI et al., 2001). A um sensor com transdução eletroquímica é possível aliar a especificidade de uma enzima e obter-se um biossensor que possa ser utilizado com sucesso nos mais variados procedimentos analíticos. Alguns biossensores enzimáticos podem determinar a concentração de carboidratos (glicose, galactose e frutose), proteínas (creatinina), aminoácidos (glutamato) e metabólitos em sangue, tecidos e fluidos biológicos (ZHANG et al., 2000). Assim, os biossensores eletroquímicos, particularmente os enzimáticos, apresentam uma

grande diversidade que vai desde dispositivos comerciais para determinação da taxa de glicose no sangue até análise de vários metabólitos (WANG, 1999b).

A resposta de um eletrodo enzimático depende tanto da atividade e das propriedades da enzima imobilizada, quanto das propriedades eletroquímicas do material de eletrodo. Para conseguir um biossensor viável, com boa sensibilidade e estabilidade operacional, a enzima deve estar apropriadamente ligada ao transdutor para facilitar a transferência de elétrons (no caso de transdutores eletroquímicos). Portanto, a imobilização da enzima sobre o transdutor é uma das etapas cruciais na preparação de um biossensor.

5 ENZIMAS

As enzimas são catalisadores químicos de origem biológica sintetizadas por organismos vivos. São, normalmente, constituídas por moléculas de alta massa molar, que aceleram grande variedade de reações envolvidas nas atividades metabólicas fundamentais das células e possuem sítios de ligação muito bem definidos para o substrato. Uma enzima é capaz de catalisar uma reação particular de um substrato, mesmo existindo isômeros deste substrato ou compostos de estrutura similar devido à sua alta especificidade, além de sua elevada sensibilidade (GUIBALT, 1984).

As enzimas têm massa molar que varia de cerca de doze mil até acima de um milhão. São portanto muito grandes quando comparadas com os substratos ou com os grupos funcionais sobre os quais agem. Algumas enzimas são formadas por cadeias polipeptídicas e não contêm nenhum outro grupo químico além de resíduos de aminoácidos. Outras, para terem atividade necessitam de um componente químico adicional chamado cofator. O cofator pode ser inorgânico, como Cu^{+2} ,

Zn^{+2} , Fe^{+2} ou Fe^{+3} ou pode ser uma molécula orgânica complexa chamada coenzima. Algumas enzimas precisam de ambos: uma coenzima e um ou mais íons metálicos para serem ativas. Em certas enzimas, a coenzima ou o íon metálico está ligado fracamente ou apenas de forma transitória à parte protéica, enquanto que em outras se ligam de modo firme e permanente; neste caso, recebe a denominação de grupo prostético. As coenzimas e os íons metálicos são estáveis ao aquecimento, enquanto a parte protéica da enzima é desnaturada pelo calor (LEHNINGER, 1989).

Atualmente, são conhecidas cerca de duas mil enzimas, sendo algumas delas comercializadas na forma pura e cristalina. O seu uso em química analítica e em outras áreas correlatas é bastante desenvolvido, permitindo a determinação de variados substratos (LASKIN, 1985). A classificação das enzimas envolve seis classes distintas, cada uma com subclasses, segundo o tipo de reação catalisada (LEHNINGER, 1989). Nesta classificação, entre outras enzimas, estão as oxiredutases, definidas como enzimas que catalisam reações de oxidação e redução e, entre as oxiredutases, estão incluídas as oxidases, as desidrogenases e as peroxidases. O nome oxidase é utilizado somente quando o O_2 é o acceptor de elétrons; dependendo da capacidade da enzima em doar dois ou quatro elétrons ao oxigênio molecular, haverá a formação de peróxido de hidrogênio ou água, como produto final. As enzimas desidrogenases catalisam reações independentemente da presença do oxigênio molecular, enquanto as peroxidases utilizam peróxido de hidrogênio como oxidante.

A otimização da reação de transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo representa um dos maiores obstáculos na construção de biossensores amperométricos (GORTON et al., 1992). Assim, o que se investiga são biossensores cuja transferência de elétrons entre o cofator da enzima redox e o eletrodo seja direta e eficiente (FREW ; HILL, 1987 ; GUO ; HILL, 1991 ; IKEDA,

1992 ; LÖTZBEYER et al., 1996), o que muitas vezes é dificultado por impedimentos cinéticos ou estéricos (HELLER, 1992).

Os eletrodos enzimáticos representam um dos mais recentes avanços em química analítica e a possibilidade de imobilização da enzima é um dos pontos que tornam este campo de pesquisa interessante, pois permite a reutilização da mesma, além de buscar conservar ao máximo a atividade da enzima na superfície do transdutor.

5.1 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização de enzimas teve um desenvolvimento muito grande nos últimos trinta anos, visto que as vantagens desta técnica vêm sendo, ao longo deste tempo, avaliada e utilizada nas mais diversas áreas. Uma das razões para a grande expansão da tecnologia da imobilização está ligada ao material de suporte, que pode agir sobre a estabilidade e a eficiência da enzima imobilizada. Quando a enzima está em solução seu comportamento é igual ao de qualquer soluto em que há uma dispersão na solução e os movimentos são livres, porém quando imobilizada estes movimentos são restritos (BICKERSTAFF, 1997). A escolha de um método de imobilização apropriado depende do tipo de transdutor usado, da natureza do analito e das condições de operação do biossensor (LUONG, 1988 ; WANG, 1994). Algumas propriedades devem ser observadas na escolha da matriz de imobilização, tais como: características físicas (área superficial, não compressibilidade, resistência, grau de porosidade), químicas (hidrofilicidade, grupos funcionais passíveis de modificação), estabilidade (mecânica e de estocagem), aspectos econômicos (custo-benefício, impacto ambiental, equipamentos e reagentes requeridos) e reação (limitações de transferência de

massa, de substância, de cofatores e de produtos) (BICKERSTAFF, 1997 ; WORSFOLD, 1995).

As enzimas podem ser imobilizadas sobre um transdutor ou uma matriz suporte através de métodos físicos e químicos. Métodos físicos como oclusão (WORSFOLD, 1995) e adsorção (MESSING, 1976) provocam pouca perturbação sobre a função e a estrutura da enzima e podem ser aplicados a muitas delas. Já os químicos são mais drásticos e podem levar a uma perda da atividade enzimática, por isso devem ser utilizados com cautela. O uso criterioso dos métodos químicos de imobilização geralmente confere ao biossensor melhor estabilidade operacional (SCOUTEN et al., 1995). Nestes métodos estão incluídas ligação cruzada e ligação covalente.

Cada enzima é única em suas características e isto influencia na escolha do procedimento de imobilização. Entretanto, a obtenção de um biossensor com estabilidade operacional depende, também, da estabilidade do suporte e do tipo de amostra, a qual pode conter diferentes ativadores e/ou inibidores (GORTON et al., 1991) e, como não existe um método ideal ou procedimento geral para a imobilização do componente biológico, a diversidade de métodos existentes permite a escolha de um que promova uma melhor imobilização e menor perda da atividade enzimática (BICKERSTAFF, 1997). Dentre os mais importantes destacam-se: ligação covalente cruzada, ligação covalente, oclusão, adsorção e encapsulação (BICKERSTAFF, 1997 ; BARKER, 1987).

5.1.1 Imobilização por Adsorção

Neste método, a imobilização ocorre principalmente através de interações entre o suporte e a enzima. Estas interações são do tipo van der Waals ou pontes de

hidrogênio que, embora fracas, ocorrem em número suficiente para que a imobilização seja possível. Entre os adsorventes mais utilizados estão o quartzo, o vidro, o carvão, a sílica-gel, a celulose e as resinas de troca iônica (CHIBATA, 1978). A grande vantagem do método reside na simplicidade e nas condições brandas com que é realizado, preservando a atividade enzimática. Além disso, é rápido, simples e barato.

Apesar destas vantagens, devido às interações envolvidas, com o decorrer do tempo há uma dessorção progressiva das moléculas de enzimas, além de serem altamente afetadas pelo pH, força iônica do meio, temperatura ou mesmo pelo substrato da enzima. Por isso, é importante o conhecimento e o controle destes fatores para conseguir imobilizar a enzima e mantê-la adsorvida com atividade.

5.1.2 Imobilização por Oclusão

Na oclusão, a imobilização da enzima acontece durante o processo de reticulação de um polímero insolúvel em água. A rede polimérica forma espaços vazios dentro dos quais a enzima fica livre na solução, diferentemente da adsorção e da ligação covalente, porém seus movimentos são limitados pela estrutura da rede.

A grande dificuldade de transporte do substrato e do produto, para dentro e para fora do polímero, respectivamente, aumentando o tempo de resposta, assim como a perda contínua de enzima pelos poros do polímero, constituem duas grandes desvantagens do método (BICKERSTAFF, 1997 ; TURNER et al., 1987).

5.1.3 Imobilização por Ligação Covalente Cruzada

Neste método de imobilização, as moléculas de enzima ligam-se entre si por pontes intermoleculares, formando uma ampla rede tridimensional. A ligação cruzada envolve a formação de ligação covalente entre enzimas, utilizando para tal, agentes bi ou multifuncionais (glutaraldeído, hexa-metil-diisocianato e outros). O grande problema destes reagentes é a toxicidade que limita o seu uso em células vivas e em diversas enzimas.

O glutaraldeído é, dos reagentes polifuncionais, o mais utilizado devido ao baixo custo e baixa toxicidade quando comparado com os demais. As ligações que se formam entre a enzima e o glutaraldeído são estáveis diante dos efeitos de pH, força iônica, solventes e temperatura (OLIVEIRA NETO ; YAMANAKA, 1988). A maior desvantagem é que muitas enzimas são sensíveis à reação e podem perder a atividade catalítica. A utilização de glutaraldeído não exige um procedimento específico para uma determinada enzima ou aplicação. Entretanto, a efetividade da imobilização depende das condições experimentais em que o procedimento é realizado, devido à multiplicidade de estruturas químicas possíveis em cada situação (WALT ; AGAYN, 1994).

5.1.4 Imobilização por Ligação Covalente

A imobilização por ligação covalente ocorre entre grupos reativos do suporte e grupos funcionais da enzima, que não sejam essenciais para a atividade catalítica da mesma. Os grupos funcionais da enzima são, por exemplo, os ácidos carboxílicos (ácido aspártico e glutâmico), amino (lisina e arginina), hidroxila (serina e teonina) e mercaptana (cisteína). Basicamente, dois passos estão envolvidos na ligação covalente entre a enzima e o suporte. No primeiro, o suporte

é ativado com o reagente específico e no segundo, a enzima é adicionada para a formação da ligação.

Esta técnica é simples e ocorre em baixas temperaturas, baixa força iônica e dentro do pH fisiológico. A escolha do reagente imobilizante tem como pré-requisito o conhecimento do aminoácido presente no centro ativo, isto porque o aminoácido não deve reagir com o reagente imobilizante. Assim, se a enzima utiliza o grupo carboxil do centro ativo para participar da catálise, é conveniente que a ligação covalente entre a enzima e o suporte se faça através do grupo amino.

5.1.5 Imobilização por Encapsulação

Neste método, a enzima, fica dentro de microcápsulas delimitadas por uma membrana semipermeável que permite a passagem do substrato e dos produtos reacionais. Os principais tipos de membranas usadas são: acetato de celulose, policarbonato, colágeno, Teflon® e Nafion®. A difusão das espécies envolvidas no processo e a retenção de produtos dentro da cápsula são as principais desvantagens do método, uma vez que podem levar a um rompimento da membrana.

6 BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS

O princípio de funcionamento de um biossensor amperométrico é a medida da corrente produzida por uma reação química entre espécies eletroativas. Esta reação química ocorre num potencial determinado e a corrente gerada está relacionada com a espécie em solução. Todavia, como estes biossensores são operados por difusão, a corrente é afetada pela velocidade com a qual o analito difunde até a superfície do eletrodo. Outro fator a considerar é que a seletividade é

governada pelo potencial redox das substâncias eletroativas presentes, de modo que a corrente medida pode incluir a contribuição de várias espécies químicas. Este tipo de biossensor representa a maioria dos dispositivos comerciais disponíveis atualmente, isto porque estes eletrodos são baseados em enzimas redoxes (oxiredutases) e existe um grande número destas enzimas disponíveis que podem atuar em ácidos graxos, açúcares, aminoácidos, aldeídos e fenóis (HENDRY et al., 1990).

Após o surgimento do primeiro biossensor onde a enzima glicose oxidase foi utilizada para detectar glicose, outras enzimas são utilizadas, juntamente com diferentes materiais, na construção de biossensores amperométricos. As enzimas redoxes, entre as quais se incluem as oxidases, as desidrogenases e as peroxidases, geralmente são úteis para estas finalidades. Tanto a produção de peróxido de hidrogênio como o consumo de oxigênio, podem ser usados como uma medida da concentração do substrato (analito).

Os biossensores nos quais o eletrodo é simplesmente usado para determinar a concentração de um dos reagentes ou de um dos produtos são chamados de *biossensores de primeira geração*. Este tipo de biossensor usa o fato de o grupo prostético de algumas enzimas ser “reciclado” através da livre difusão do co-substrato natural da enzima (por exemplo, oxigênio molecular ou NAD^+). Como alguns destes co-substratos podem ser reduzidos ou oxidados em um eletrodo metálico, estes compostos podem ser usados como pontes de ida e volta, entre a enzima e o transdutor. O decréscimo da concentração do co-substrato enzimático ou o aumento da concentração do co-produto é medido pela mudança na corrente quando é adicionado o substrato a ser determinado (HABERMÜLLER et al., 2000). Uma desvantagem destes eletrodos é a necessidade de aplicação de um potencial geralmente alto para ocorrer o evento químico. O problema é que substâncias interferentes podem ser oxidadas nestes potenciais elevados, como

também a enzima pode ser desnaturada. Outro inconveniente destes eletrodos é que são influenciados pela variação de concentração de oxigênio dissolvido.

Buscando suprir as desvantagens apresentadas pelos biossensores de primeira geração, foram desenvolvidos eletrodos modificados quimicamente em que o oxigênio molecular é substituído por um mediador para facilitar a transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo. Estes biossensores são chamados de *biossensores de segunda geração* e representam um dos principais campos de pesquisas com eletrodos enzimáticos. Os mediadores de elétrons são substâncias redoxes, de baixo peso molecular, como ferroceno, hexacianoferrato e azul de metileno, que facilitam a transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo com a vantagem de que esta reação redox ocorre em potenciais baixos, minimizando problemas de interferências e dando maior estabilidade ao composto biológico ativo, devido ao potencial aplicado (GORTON et al., 1992 ; CSÖREGI et al., 1993).

As principais características que um mediador deve apresentar: (i) o potencial formal do par redox deve ser baixo em relação ao potencial usado na oxidação ou redução de um reagente ou produto, e independente do pH; (ii) deve possuir alta estabilidade em ambos os estados redoxes; (iii) deve ser o segundo substrato para a reação enzimática; (iv) o processo eletroquímico no eletrodo deve ser reversível e não ser a etapa limitante do processo (LOBO et al., 1997 ; GHINDILIS et al., 1997 ; CHAUBEY ; MALHOTRA, 2002).

O grande interesse em construir e estudar eletrodos quimicamente modificados deve-se ao desenvolvimento de técnicas de imobilização tanto das enzimas como dos mediadores em eletrodos (GORTON, 1995). Os mediadores podem ser incorporados aos eletrodos por adsorção, oclusão em filmes poliméricos, ligação covalente ou simplesmente misturados em pasta de carbono.

A função do mediador é auxiliar a troca eletrônica entre a enzima e o eletrodo, quando esta é favorável termodinamicamente e não cineticamente. O processo de eletrodo ocorre em potencial característico do mediador cuja função é regenerar a enzima e levar os elétrons até o eletrodo (WILSON, 1987).

Alguns biossensores de segunda geração são comercializados na forma descartável. A MediSense foi a primeira companhia a colocar no mercado um produto da segunda geração de biossensores para o monitoramento de glicose no sangue, para uso domiciliar. O mediador usado é ferroceno. Com a junção da MediSense com os Laboratórios Abbot outros biossensores amperométricos de segunda geração poderão ser colocados no mercado (BANSI ; CHAUBEY, 2003).

Quando a transferência de elétrons acontece diretamente entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo, os biossensores são chamados *biossensores de terceira geração* e se caracterizam pela ausência de mediadores. A ausência de mediador propicia ao biossensor uma seletividade superior porque pode operar num potencial mais próximo ao potencial redox da enzima e está menos sujeito às reações interferentes que também são evitadas devido à ausência de reagentes necessários para que aconteçam (GORTON, 1995). A transferência de elétrons depende da distância entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo (GHINDILIS, 1997). Embora o uso destes biossensores apresente vantagens como a eliminação das etapas de reação dos mediadores e a possibilidade de imobilizar uma quantidade maior de enzima, aumentando deste modo o sítio de reação por área do transdutor, o uso dos mesmos ainda é restrito pois está atrelado ao conhecimento do mecanismo envolvido.

Diferentes materiais podem ser usados para a construção de biossensores amperométricos, mas a imobilização de biomoléculas em eletrodos tradicionais, como ouro e platina, não é um processo fácil. Assim, a utilização de novos materiais e/ou a modificação de eletrodos tem atraído grande interesse nos últimos

anos, sendo os materiais carbonáceos – grafite pirolítico, carbono vítreo, pasta de carbono, fibra de carbono – muito utilizados, pois possuem baixa resistência elétrica (ZHANG, 2000).

Entre os materiais carbonáceos, a pasta de carbono representa um dos mais empregados. Ela é constituída de hidrocarbonetos e grafite, podendo ou não ter modificadores (matrizes e mediadores). A função dos hidrocarbonetos é fixar a pasta ao eletrodo, preencher as cavidades entre as partículas de grafite e “isolar” o mesmo do contato com soluções aquosas. Os hidrocarbonetos geralmente são óleos não condutores (parafina, silicone, Nujol). A grafite em pó utilizada deve apresentar partículas de tamanho inferior a 20 μm (os mais usados estão entre de 0,1 a 0,5 μm), para facilitar o ajuste da superfície, evitando a presença de ruído devido à alta heterogeneidade e permitindo a melhor análise da amostra. O grande uso da pasta de carbono está também ligado ao fato de sua superfície ser facilmente renovada, apresentar baixa corrente de fundo, ampla faixa de potencial, a sua composição poder ser modificada e também por existir uma grande proximidade entre a matriz condutora, a enzima e outros aditivos que façam parte da mesma (KALCHER et al., 1995 ; POPESCU et al., 1995). A modificação interna do material eletródico, diferentemente do que ocorre com os eletrodos sólidos convencionais, em que a modificação ocorre apenas na superfície, resulta numa configuração de eletrodo que permite a sua utilização sem a necessidade de adição de reagentes durante a determinação (PEREIRA et al., 2002).

As propriedades acima citadas fazem da pasta de carbono uma matriz adequada para imobilização de enzimas e dos biossensores amperométricos de pasta de carbono, uma ferramenta prática para a determinação rápida e barata de neurotransmissores.

6.1 EFEITOS DE ADITIVOS NA SENSIBILIDADE E ESTABILIDADE DE BIOSENSORES

A estabilização de enzimas é de grande interesse em biossensores nos quais o tempo de estocagem e a estabilidade durante a sua utilização são necessários. Portanto, é possível definir dois tipos de estabilidade: a estabilidade de estocagem e a estabilidade operacional. A estabilidade de estocagem é reconhecida como manutenção da atividade enzimática quando guardada em condições específicas, depois de manufaturada. A estabilidade de um biossensor é sempre um fator decisivo para a sua viabilidade comercial (GIBSON, 1999).

Ao lado da estabilidade de estocagem existe a estabilidade operacional definida como a retenção da atividade da enzima quando em uso. Este é um dos parâmetros mais mencionados nas publicações a respeito de biossensores onde são relatados o tempo de vida e a reutilização dos mesmos.

Nos biossensores de pasta de carbono, devido aos seus mais variados usos, são necessários os dois tipos de estabilidade. Como a pasta não está toda em contato com o analito, é preciso uma estabilidade de estocagem; e é importante que haja estabilidade operacional para que o biossensor possa ser usado várias vezes.

Como já foi mencionado anteriormente, os biossensores são dispositivos versáteis e de baixo custo. Além destas características, os biossensores apresentam a vantagem da possibilidade de modificação, fazendo com que haja uma aproximação maior entre a enzima, a matriz condutora e os aditivos (POSPECU et al., 1995). Isto proporciona um ambiente protetor à enzima, podendo resultar em um aumento de estabilidade.

Alguns aditivos como polietilenoglicol (POSPECU et al., 1995), DNA (DANTONI et al., 1998 ; ROSATTO et al., 2001), antibióticos catiônicos, polímeros, pequenas moléculas não carregadas e proteínas carregadas

negativamente (LUTZ et al., 1988) podem ser usadas para melhorar a sensibilidade e também a estabilidade operacional.

A utilização de DNA por Dantoni et al. (1998) foi feita com o objetivo de preservar a atividade da enzima tirosinase em um biossensor para difenol; em comparação com outro biossensor sem o aditivo foi verificado que houve um aumento substancial na corrente.

A influência dos aditivos polietilenoimina (PEI), albumina de soro bovino (BSA) e DNA, sobre a sensibilidade e estabilidade operacional de um biossensor, à base de peroxidase, para fenol foram estudadas por Rosato et al (2001). Os resultados mostraram que existe uma melhora na sensibilidade e também na estabilidade do biossensor quando da incorporação do DNA, o que permitiu a sua utilização na determinação de fenol em amostras de efluentes industriais e também em água de rios poluídos. Devido à alta afinidade entre avidina/biotina (ou estreptavidina/biotina), este sistema de acoplamento tem sido usado na imobilização de biomoléculas na superfície de um sensor, pois esta técnica pode promover um alto grau de controle sobre a estrutura molecular da enzima, mantendo a sua atividade por mais tempo (MOUSTY et al., 2001 ; COSNIER, 1999). Pantano e Kuhr (1993) utilizaram esta tecnologia para imobilizar alguns tipos de desidrogenase em microeletrodo de fibra de carbono, enquanto que Hoshi et al. (1995) imobilizaram glicose oxidase em eletrodo de platina. Darain et al. (2003) propuseram um eletrodo “screen-printed” utilizando HRP e o sistema estreptavidina/biotina, para determinação de imunoglobulina G em coelhos.

7 BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos podem ser determinados, amperometricamente, através da oxidação eletroquímica direta (BURESTEDT et al., 1996 ; TARASEVICH et al., 1999). Entretanto, o potencial aplicado para que a oxidação ocorra é normalmente alto, o que provoca uma grande corrente de fundo e, conseqüentemente, um nível alto de ruído. Neste tipo de determinação, podem acontecer diversas reações paralelas que conduzem à formação de produtos poliméricos, os quais levam à passivação e/ou ao bloqueio da superfície do eletrodo. O uso de biossensores amperométricos pode minimizar estes obstáculos, pois estes operam em baixo potencial. A corrente gerada, pela reação biocatalisada de oxidação ou redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo, não possui a contribuição de espécies interferentes (GORTON et al., 1992 ; CSÖREGI et al., 1993 ; MARKO-VARGA et al., 1995 ; BURESTEDT et al., 1996).

Os biossensores amperométricos usados na determinação de compostos fenólicos são construídos principalmente em duas configurações: (i) eletrodos de grafite sólida com a superfície modificada, onde a enzima é fisicamente adsorvida, covalentemente imobilizada ou segura com o auxílio de uma membrana; (ii) eletrodos compósitos modificados, onde as partículas de grafite são modificadas com enzimas, por procedimentos semelhantes ao do eletrodo de grafite sólida e, em seguida, misturadas com óleos, resinas epóxi ou partículas de Teflon®. Estes dois tipos de eletrodos servem como base para as enzimas tirosinase, lacase e peroxidase, que são as mais usadas na determinação de compostos fenólicos. E, embora possuam mecanismos de ação diferentes, as atuações destas enzimas podem ser esboçadas como uma seqüência de reações similares, como está mostrado na Figura 5 (MARKO-VARGA et al., 1995).

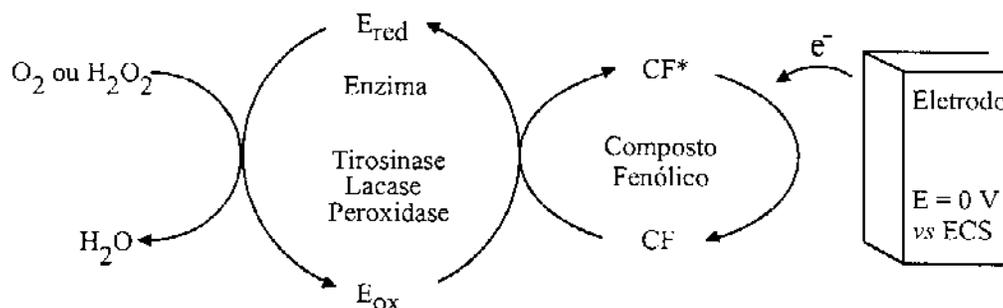


Figura 5 - Mecanismo de reações em eletrodos modificados por enzimas para a determinação de compostos fenólicos. E_{red} e E_{ox} são, respectivamente, as formas reduzida e oxidada das enzimas; CF = composto fenólico.

As moléculas de enzima presentes na superfície do eletrodo são oxidadas pelo oxigênio (no caso da tirosinase e da lacase) ou pelo peróxido de hidrogênio (no caso da peroxidase) e, em seguida, são reduzidas por compostos fenólicos. Durante esta última reação, os fenóis são convertidos em quinonas e/ou radicais livres. Como estes produtos em geral são eletroativos, podem ser reduzidos na superfície do eletrodo em potenciais mais negativos que 0 V vs ECS (Eletrodo de Calomelano Saturado). A corrente de redução medida é proporcional à concentração do composto fenólico na solução.

O monitoramento da concentração de compostos fenólicos também pode ser feito através da medida do consumo de oxigênio ou H₂O₂. Entretanto, de acordo com Marko-Varga et al. (1995), o método de detecção de fenóis baseado na redução dos produtos gerados pelas reações enzimáticas apresenta vantagens como a simplicidade de construção e manuseio; proteção do eletrodo contra acúmulo de produtos poliméricos secundários sobre a sua superfície (passivação), geralmente observado na oxidação eletroquímica direta de fenóis; amplificação da resposta como uma consequência da redução de quinonas e/ou radicais fenoxis ao composto

fenólico inicial; faixa de potencial de trabalho enquadrada no intervalo de potenciais ótimo para medidas eletroquímicas, ou seja, entre 0 e $-0,2$ V vs ECS.

8 BIOSSENSORES PARA NEUROTRANSMISSORES

O interesse no desenvolvimento de sensores para uso em áreas biomédicas vem crescendo rapidamente. O aperfeiçoamento dos mesmos é cada vez maior de modo que o seu uso poderá provocar um grande impacto no cuidado com a saúde neste início de século. Novas tendências estão surgindo, entre elas a integração de sensores com analisadores miniaturizados, desenho genético de elementos de reconhecimento, rápido crescimento de genossensores, monitoramento ultra-rápido de eventos dinâmicos em ambientes microscópicos, incluindo sistemas unicelulares e eletrodos moleculares. Pode-se incluir também os novos materiais que proporcionam um aumento na sensibilidade. Estes campos de emergência, somados com a investigação contínua de novos biossensores baseados na transdução eletroquímica, óptica ou piezoelétrica, irão sem dúvida aumentar o poder dos biossensores e da eletroanálise na área clínica (WANG, 1999b).

Os biossensores enzimáticos prestam-se atualmente a um elevado número de determinações analíticas, em particular em testes clínicos. A taxa sanguínea de glicose, informação vital para controle da diabete, é sem dúvida a principal aplicação atual. Os metabólitos creatinina, sacarose, colesterol, triglicérides, oxalato, salicilato e uréia, entre outros, são pesquisados pois sua concentração no plasma sanguíneo, em tecidos ou na urina, pode ser relevante para um diagnóstico clínico.

As catecolaminas assim como a serotonina desempenham, como neurotransmissores, um papel importante no organismo. Suas concentrações em

diferentes fluidos biológicos servem como indicador de várias enfermidades. Como já foi mencionado anteriormente, o método mais usado para analisar esses compostos é HPLC com detecção eletroquímica. Entretanto, uma alternativa não instrumental que vem ganhando atenção é o uso de sensores enzimáticos que, com o desenvolvimento de novas tecnologias, já pode ser usado em análise de neurotransmissores no organismo humano cuja concentração está entre picomolar e nanomolar (SZEPONIK, 1997).

A imobilização da quinoproteína glicose desidrogenase em pasta de carbono (WOLLENBERGER ; NEUMANN, 1996) ou em eletrodo platinizado (LISDAT et al., 1998) foi realizada na construção um biossensor para determinação de catecolaminas. A resposta do sensor está baseada na oxidação eletroquímica do composto que está sendo determinado, seguido de sua regeneração enzimática sempre que na solução houver um excesso de glicose. Os sensores que envolvem um passo de regeneração catalítica são em geral duas ou três vezes mais sensíveis do que aqueles que usam a enzima imobilizada em eletrodo de oxigênio tipo Clark.

Tecidos de vários vegetais foram usados como fonte de polifenol oxidase (PPO) na determinação de catecolaminas por Fornasi et al. (1997). A PPO catalisa a oxidação de catecol a ortoquinona na presença de oxigênio. Os biossensores estudados apresentaram boa estabilidade, o que tornou possível o seu uso em determinações analíticas, com uma ampla resposta linear, reprodutibilidade e um limite de detecção que dependeu da fonte enzimática. O biossensor construído com tecido de batata foi usado para verificar a qualidade de uma formulação farmacêutica contendo dopamina. O resultado obtido mostrou um erro de 1,0 %, assumindo que os valores apresentados no rótulo eram verdadeiros.

As dimensões das fibras de carbono têm-se mostrado úteis na fabricação de microeletrodos. Cosnier et al. (1997) imobilizaram eletroquimicamente a enzima PPO, em filme polimérico, para determinar dopamina. O biossensor apresentou

resposta linear entre 5×10^{-8} e 8×10^{-5} mol L⁻¹, limite de detecção de 5×10^{-8} mol L⁻¹ e uma sensibilidade de 59 mA L mol⁻¹ cm⁻², sendo aplicado o potencial de - 0,2 V vs ECS.

Leite e col. (2003a) propuseram um biossensor de pasta de carbono, modificado com extrato enzimático do fungo *Pleurotus ostreatus* como fonte de lacase. O biossensor foi testado na determinação de epinefrina e dopamina em formulações farmacêuticas e os resultados obtidos concordam em nível de 95% de confiança com o procedimento da Farmacopéia Americana.

Lisdat et al. (1997) utilizaram um eletrodo de carbono vítreo modificado pela enzima lacase ou glicose desidrogenase PQQ (polipirrolquinolina quinona) dependente, imobilizadas em membrana polimérica para determinação de catecolaminas. O limite de detecção encontrado foi da ordem nmol L⁻¹. Foram estudados também sistemas bienzimáticos combinando a glicose desidrogenase com lacase ou tirosinase, sendo a melhor sensibilidade apresentada pela combinação lacase/glicose desidrogenase. Neste sistema, a catecolamina é oxidada pela lacase resultando numa quinona, havendo consumo de oxigênio durante a reação. Na segunda reação de oxidação, a glicose desidrogenase transforma a glicose em gliconato, enquanto a quinona é novamente reduzida à catecolamina na superfície do eletrodo.

A mesma combinação lacase/glicose desidrogenase PQQ dependente, juntamente com um detector amperométrico de oxigênio, em um sistema em fluxo, foi utilizado por Szeponik et al. (1997) para determinar adrenalina. O biossensor consistiu em uma membrana polimérica, com as enzimas imobilizadas, fixada em um anel de sustentação. A membrana esteve em contato direto com o eletrodo de oxigênio e o potencial aplicado foi de - 600 mV vs Ag/AgCl. Foi determinado um limite de detecção de 200 pmol L⁻¹ usando-se poliuretano como matriz polimérica e 1 nmol L⁻¹ quando a matriz foi álcool polivinílico.

Um biossensor com as enzimas lacase e peroxidase imobilizadas em pasta de carbono foi utilizado por Leite et al. (2003b) na determinação de dopamina e epinefrina. A combinação das duas enzimas mostrou um efeito sinérgico na análise das catecolaminas estudadas. O eletrodo apresentou resposta linear em medidas voltamétricas entre $6,6 \times 10^{-6}$ e $3,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para solução de dopamina e entre $6,1 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para solução de epinefrina. Os limites de detecção observados foram de $2,7 \times 10^{-8}$ para a dopamina e $2,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para a epinefrina.

Apesar da importância da determinação de neurotransmissores, a literatura mostra que a análise dos mesmos utilizando biossensores ainda é inexpressiva, indicando que existe um vasto campo de investigação a ser preenchido.

9 BIOSSENSORES À BASE DE PEROXIDASE

As peroxidases são enzimas que utilizam o peróxido de hidrogênio, ou peróxidos orgânicos de cadeia pequena, para catalisar a oxidação de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Possuem um grupo heme com o íon ferro no estado de oxidação +3. Das seis posições de coordenação possíveis para o ferro, quatro são feitas por átomos do grupo heme (Figura 6) e uma por um nitrogênio axial da histidina. A sexta posição de coordenação é livre e neste caso cada elétron ocupa um orbital d separado ($S=5/2$) (BANCI, 1997). Essas enzimas são encontradas tanto no reino animal quanto no reino vegetal e a maioria delas – citocromo c peroxidase, cloroperoxidase, lactoperoxidase, peroxidase de plantas, etc. – apresentam um grupo heme prostético com um ciclo catalítico comum (RUZGAS et al., 1996).

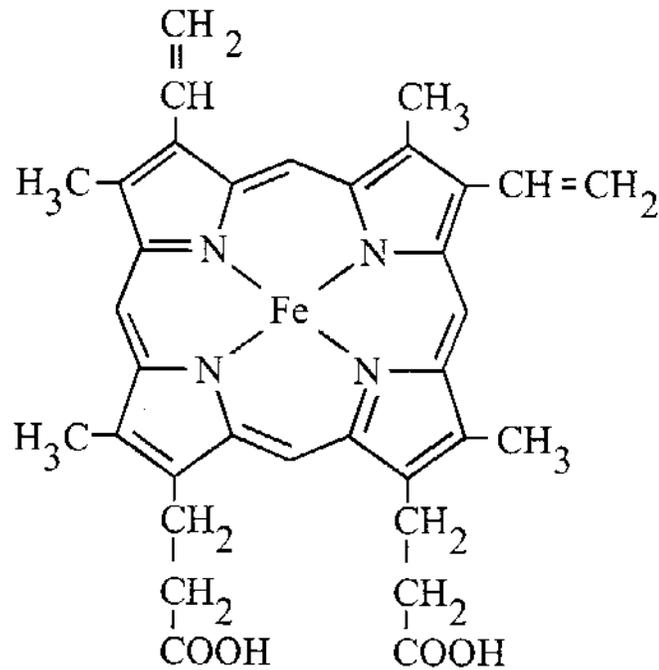
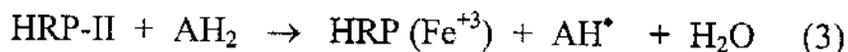


Figura 6 - Estrutura da molécula protoporfirina de ferro

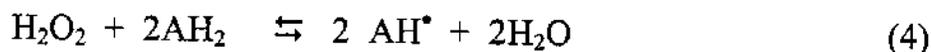
A enzima horseradish peroxidase (HRP) apresenta várias vantagens que possibilitam o seu uso em muitas aplicações analíticas como, por exemplo, a construção de biossensores amperométricos para a determinação de compostos fenólicos e catecólicos. Características como a alta velocidade de transferência de elétrons entre o eletrodo e a enzima imobilizada, boa estabilidade em água e em solventes orgânicos e a oxidação de alguns substratos, usando o oxigênio no lugar do peróxido, têm estimulado o seu uso em dispositivos analíticos (RUZGAS et al., 1995 a/b ; ROSSATO et al., 1999 ; ROSSATO et al., 2001 ; ROSSATO et al., 2002).

De forma simplificada, o ciclo catalítico da HRP pode ser representado pelas equações:





Na primeira etapa ocorre a redução do peróxido de hidrogênio com a conseqüente oxidação da enzima. Esta última reação envolve dois elétrons do grupo prostético heme da peroxidase; um elétron é fornecido pelo ferro (III) e o outro vem da porfirina, produzindo um cátion radical porfirínico. A enzima reduz o peróxido de hidrogênio com a formação de um composto intermediário da enzima, denominado de composto I. A regeneração da proteína à sua forma nativa ocorre em duas etapas monoelétrônicas posteriores. O composto I oxida uma molécula de substrato (AH_2) formando um substrato radicalar (AH^\bullet) e o composto II é reduzido ao estado inicial HRP (Fe^{+3}) por uma segunda molécula de substrato (RUZGAS et al., 1996). A soma das equações de 1 a 3 seria:



O ciclo catalítico é complexo, ocorrendo em diferentes etapas em que, os produtos formados durante a reação dependem da natureza do segundo substrato. A oxidação a espécies radicalares somente ocorre com substratos doadores de elétrons como aminas aromáticas ou compostos fenólicos. Os produtos finais da oxidação destes compostos podem polimerizar ou formar dímeros, reagindo com outros substratos produzindo outras espécies radicalares adicionais que podem participar de reações secundárias (Equações 5, 6 e 7) (RUZGAS et al., 1995).

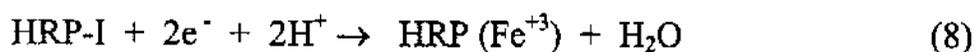




Estudos realizados mostram que o composto HRP-I é verde, apresentando $\lambda_{\text{max}} = 410 \text{ nm}$ e 655 nm , no qual o íon metálico encontra-se com carga formal Fe (V); entretanto, a mais aceita é que seja um cátion radical porfirínico contendo Fé (IV). O composto HRP-II apresenta uma coloração vermelha e $\lambda_{\text{max}} = 420, 527 \text{ e } 555 \text{ nm}$ (CHANCE, 1949 ; LA MAR ; ROPP, 1980 ; FOLKES ; CANDEIAS, 1997).

Os eletrodos amperométricos modificados com peroxidase são amplamente utilizados na determinação de peróxidos e também de outros analitos importantes como as aminas aromáticas e os compostos fenólicos devido às características que a HRP possui e que favorecem a determinação destas substâncias.

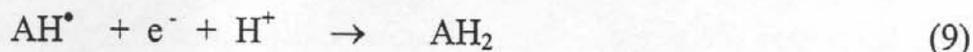
Quando a peroxidase é imobilizada na superfície de um eletrodo, a forma oxidada da enzima, que é formada na reação com o peróxido (seu substrato natural), pode ser reduzida à sua forma nativa através de uma transferência de elétrons direta ou por meio de uma transferência mediada. De acordo com Lindgren et al. (2000), se a peroxidase é imobilizada em um eletrodo de grafite, este pode substituir o substrato doador de elétrons (AH_2). A enzima é oxidada pelo peróxido de hidrogênio, de acordo com a equação (1), e na seqüência é reduzida pelos elétrons fornecidos pelo eletrodo, como é mostrado na seguinte reação:



Este processo, em que o eletrodo substitui o substrato doador de elétrons, é conhecido como transferência direta de elétrons.

No sistema de transferência de elétrons mediada, em que estão presentes o peróxido de hidrogênio e um doador de elétrons (AH_2) como fenol, hidroquinona

ou catecol, os processos direto e mediado podem ocorrer simultaneamente e a forma oxidada do doador (AH^{\bullet}) é reduzida pelo eletrodo, em potencial adequado, de acordo com a seguinte reação:



A transferência de elétrons mediada é, geralmente, mais eficiente que a transferência de elétrons direta (RUZGAS et al., 1995b ; RUZGAS et al., 1996 ; GHINDILIS et al., 1997) e pode ser utilizada analiticamente para determinar a concentração de mediadores como fenóis, aminas aromáticas e outros, usando uma concentração fixa de H_2O_2 (RUZGAS et al., 1995a ; LINDGREN et al., 1997).

O mecanismo enzimático envolvido (Figura 7) consiste na oxidação da molécula de enzima, na presença de peróxido de hidrogênio, seguida de sua redução por espécies doadoras de elétrons, como as catecolaminas e a serotonina.

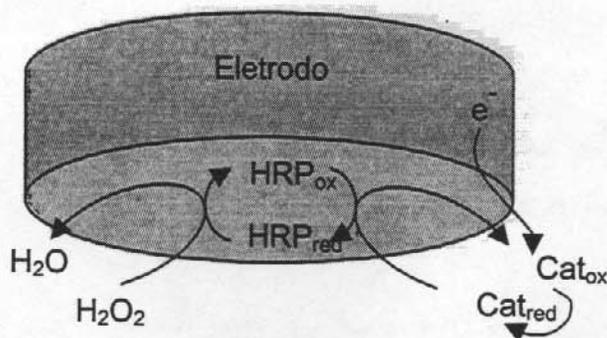


Figura 7 - Mecanismo de transferência de elétrons mediada em eletrodo de pasta de carbono. Cat_{red} e Cat_{ox} são as formas reduzida e oxidada dos compostos catecolícos, respectivamente.

Os produtos desta última reação são quinonas e/ou espécies eletroativas que podem ser eletroquimicamente reduzidas na superfície do eletrodo. A corrente de redução gerada é proporcional à concentração da espécie catecólica em solução (ROSSATO et al., 1999 ; LINDGREN et al., 1997 ; RUZGAS et al., 1995a).

Com base nestes princípios, muitos compostos fenólicos, catecólicos e outras substâncias doadoras de elétrons são determinadas utilizando biossensores com HRP imobilizada (MARKO-VARGA et al., 1995 ; RUZGAS et al., 1995^a ; RUZGAS et al., 1996 ; MUNTEANU et al., 1998 ; GORTON et al., 1999 ; ROSSATO et al., 1999 ; ROSSATO et al., 2001 ; LINDGREN et al., 2000 ; RUAN ; LI, 2001).

10 OBJETIVOS

Na procura de novas ferramentas para determinar neurotransmissores, o presente trabalho teve como objetivo geral, desenvolver um biossensor amperométrico, à base de peroxidase imobilizada em pasta de carbono, visando à sua utilização em análise de amostras reais.

10.1 OBJETIVOS ESPECÍFCOS

- Otimizar o processo de imobilização da enzima, buscando um contato íntimo entre a enzima e o eletrodo.
- Investigar as melhores condições de pH, concentração de peróxido de hidrogênio, força iônica, potencial aplicado e tipo de solução tampão visando à otimização do biossensor.
- Empregar o biossensor desenvolvido na determinação de neurotransmissores em amostras biológicas.

11 METODOLOGIA

11.1 REAGENTES E MATERIAIS

- **NEUROTRANSMISSORES**

Serotonina (Sigma, EUA), dopamina (Sigma, EUA), epinefrina (Aldrich, EUA), norepinefrina (Aldrich, EUA).

- **REAGENTES DE IMOBILIZAÇÃO**

Albumina de soro bovino (BSA) (Sigma, EUA), 1-ciclohexil-3-2-(morfolinoetil) carbodiimida meta-p-toluenosulfato (Sigma, EUA), glutaraldeído 50 % (m/v) (Fluka, Suíça), grafite em pó 99,9 % (Aldrich, EUA).

- **ENZIMA**

Horseradish peroxidase (HRP) (E.C.1.11.1.7) 290 U/mg (Sigma, EUA).

- **SUBSTRATO DA ENZIMA**

Peróxido de hidrogênio 30 % (m/v) (Synth, Brasil).

- **TAMPÕES**

Fosfato monobásico de potássio (Synth, Brasil), tris-hidroximetilaminometano (Tris) (Sigma, EUA), ácido 1,4- piperazina-dietano sulfônico (Pipes) (Sigma), ácido N, 2-hidroxi-etil-piperazina-dietano sulfônico (Hepes) (Sigma, EUA). O ajuste de pH foi feito em pHmetro da Corning modelo 350, utilizando-se um eletrodo de vidro combinado. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (Millipore, EUA).

- **AGENTE AGLUTINANTE**

Óleo mineral Nujol.

- **ADITIVOS**

DNA (D1626 de testículos de salmão), polietilenoimina (PEI) (Sigma, EUA), streptavidina (Sigma, EUA), biotina (Aldrich, EUA).

11.2 CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR

Na construção do biossensor para neurotransmissores foram realizados oito procedimentos diferentes para imobilizar a enzima HRP, com o objetivo de avaliar qual biossensor apresentava maior sensibilidade.

11.2.1 Imobilização da Enzima na Grafite sem Carbodiimida

Para facilitar a elaboração do texto, cada tipo de imobilização recebeu uma demoninação de **B1** até **B8**.

i) Imobilização por adsorção (**B1**): foram misturados 250 μL de solução aquosa de HRP (290 U mL^{-1}), 160 μL de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e 40 mg de grafite em pó.

ii) Imobilização através de ligação covalente cruzada com glutaraldeído (**B2**): foram misturados 250 μL de solução aquosa de HRP (290 U mL^{-1}), 6 μL de

glutaraldeído a 5% (v/v), 160 μL de solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) e 40 mg de grafite em pó.

iii) Oclusão com BSA (**B3**): foram misturados 250 μL de solução aquosa de HRP (290 U mL^{-1}), 160 μL de uma solução 2,5 mg mL^{-1} de BSA preparada em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) e 40 mg de grafite em pó.

iv) Imobilização com glutaraldeído e BSA (**B4**): foram misturados 250 μL de solução aquosa de HRP (290 U mL^{-1}), 6 μL de glutaraldeído a 5% (v/v), 160 μL de uma solução 2,5 mg mL^{-1} de BSA preparada em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) e 40 mg de grafite em pó.

11.2.2 Imobilização da Enzima na Grafite via Carbodiimida

i) Imobilização por ligação covalente através de carbodiimida (**B5**): Primeiramente foi feita a ativação da grafite em pó com carbodiimida (CDI) segundo procedimento de Gorton et al. (1992). Foram misturados 4,2 mg de carbodiimida em 300 μL de solução tampão acetato 0,05 mol L^{-1} (pH 4,8) e 300 mg de grafite em pó e deixado reagir por 2 h a 25 $^{\circ}\text{C}$. Após esse tempo, o material obtido foi lavado com água e deixado secar por 4 h em temperatura ambiente. Para imobilização da enzima foram misturados 250 μL de solução aquosa de HRP (290 U mL^{-1}), 160 μL de solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) e 40 mg de grafite em pó ativada com carbodiimida (GCDI).

ii) Imobilização com glutaraldeído (**B6**): Nesta imobilização foram usados 40 mg de material GCDI e misturados 250 μL de solução aquosa de HRP (290 U

mL^{-1}), 6 μL de glutaraldeído a 5% (v/v) e 160 μL de solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0).

iii) Imobilização com BSA (**B7**): Para esta imobilização foram usados 40 mg de material GCDI, misturados 250 μL de solução aquosa de HRP (290 U mL^{-1}) e 160 μL de uma solução 2,5 mg mL^{-1} de BSA preparada em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0).

iv) Imobilização com glutaraldeído e BSA (**B8**): Para esta imobilização foram usados 40 mg de material GCDI, misturados 250 μL de solução aquosa de HRP (290 U mL^{-1}), 6 μL de glutaraldeído a 5% (v/v) e 160 μL de uma solução 2,5 mg mL^{-1} de BSA preparada em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0).

Em todos os casos, as misturas foram mantidas a 4 $^{\circ}\text{C}$, por 16 h, de modo a permitir a imobilização da enzima sobre a grafite. Após este tempo, foi obtido o material seco ao qual foram adicionados 30 μL de óleo mineral (Nujol), misturando-se até obter uma pasta homogênea. Os biossensores foram construídos colocando a pasta modificada em um tubo de vidro, contendo uma cavidade com um disco de platina de 0,07 cm^2 de área.

11.3 MEDIDAS AMPEROMÉTRICAS

As medidas amperométricas foram realizadas com o auxílio de um potenciostato PGSTAT30 AUTOLAB[®] (Ecochemie, Holanda) interfaceado a um microcomputador para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados. Foi empregada uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, onde o

biossensor desenvolvido foi utilizado como eletrodo de trabalho, um fio de platina como eletrodo auxiliar e, como eletrodo de referência, foi usado um eletrodo de calomelano saturado (ECS). Todos os experimentos foram conduzidos em potencial fixo e com o monitoramento da corrente de difusão resultante. As medidas foram realizadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e temperatura ambiente.

11.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DO BIOSENSOR

Na otimização do biossensor, os eletrodos de trabalho, de referência e auxiliar foram posicionados na célula eletroquímica contendo 5 mL de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e o comportamento do sistema foi estudado através da cronoamperometria. Fatores como a concentração de peróxido de hidrogênio, pH, composição e concentração da solução tampão, assim como o potencial aplicado e a quantidade de enzima na pasta influenciam na resposta do biossensor e por isso foram investigados a fim de se obter as melhores condições de resposta.

Estabelecidas as melhores condições, a etapa seguinte foi a obtenção da curva analítica; e por ela é possível tirar informações como sensibilidade, intervalo de resposta linear, limite de detecção e tempo de resposta (CASS, 1990). No início de cada experimento, foram feitos a aplicação um determinado potencial e o registro da corrente em função do tempo, até esta atingir um valor constante. Este procedimento foi realizado na presença da solução tampão e de peróxido de hidrogênio, que é o substrato específico da peroxidase. A corrente registrada nestas condições foi chamada corrente de fundo, I_f , ou corrente capacitiva do sistema.

Com a corrente estabilizada, houve a adição do analito e a homogeneização da solução com o auxílio de um agitador magnético, durante 20 segundos. No intervalo de tempo entre a adição do analito e a homogeneização da solução, a corrente não foi registrada e houve somente a aplicação do potencial.

As respostas foram calculadas através da comparação entre a corrente obtida e a corrente de fundo, ou a corrente obtida na adição anterior. Foram feitas adições sucessivas de analito, sendo que cada adição correspondeu a uma concentração de neurotransmissor de $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, que forneceu um valor de Δj . Somando-se as variações em densidade de corrente para as demais adições, foram construídos os gráficos ΔI vs C .

Todas as condições experimentais para o biossensor em estudo foram otimizadas utilizando a serotonina como composto de referência.

11.5 RESPOSTA PARA DIFERENTES NEUROTRANSMISSORES

A resposta para diferentes neurotransmissores foi pesquisada através da obtenção de curva analítica para cada um deles. Este tipo de experimento permite prever o comportamento do biossensor em relação à seletividade com o propósito de sua aplicação em análise de amostras reais. A faixa linear estudada foi a mesma para todos os compostos investigados.

11.6 EFEITO DE ADITIVOS NA PASTA

À pasta de carbono foram incorporados os aditivos polietilenoimina (PEI) dissolvido em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), DNA preparado em tampão

acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7), biotina e streptavidina dissolvidos em água. Todos os aditivos foram acrescentados no momento da imobilização da enzima, juntamente com os demais reagentes. A quantidade de PEI e DNA na pasta foi de 0,1 mg, enquanto que o teor do par biotina/streptavidina (ST/BIOTINA) foi 0,001 mg de biotina para 1U de streptavidina. A pasta preparada foi guardada em geladeira e utilizada por até cinco dias.

A avaliação do efeito dos aditivos na sensibilidade do biossensor foi feita através da construção de curvas analíticas, usando as diferentes preparações, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), $E = -50 \text{ mV vs ECS}$. A estabilidade da pasta foi avaliada a partir da variação da sensibilidade apresentada pelo eletrodo nas diferentes curvas analíticas.

11.7 ESTUDOS DE INTERFERENTES

O estudo dos interferentes sobre a resposta do biossensor foi realizado preparando-se soluções com diferentes razões molares de serotonina e os interferentes ácidos ascórbico e úrico (1:0; 1:0,25; 1:0,5; 1:1 e 1:2). Os efeitos destes interferentes foram estudados avaliando-se as mudanças sobre a corrente de resposta do biossensor.

11.8 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

Foram analisadas sete amostras de soro sanguíneo de rato. As amostras não sofreram qualquer tratamento prévio antes das análises. A recuperação foi

calculada comparando-se as respostas obtidas em solução padrão, antes e depois da adição do soro sanguíneo de rato.

11.8.1 Recolha das Amostras

O soro sanguíneo de rato foi fornecido pelo professor Dr. José A. R. Gontijo e coletado pelo Sr. Ricardo S.O. Horiuchi, do laboratório de Metabolismo Hidro Salino do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP. Todas as amostras foram utilizadas sem nenhum pré-tratamento antes das análises.

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, com peso entre 250 e 300 g, idade entre 3 e 4 meses e alimentados com ração padrão para ratos da Labina C, Purina, Campinas. A água fornecida foi de torneira. Os animais eram mantidos em caixas com no máximo quatro unidades e com um tipo de palha denominada maravalha, que foi trocada a cada dois dias, assim como a ração e a água. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp. O sangue é retirado por punção cardíaca, que é a forma que fornece o maior volume rapidamente, mas com a morte do animal. Antes do processo, o animal é anestesiado com Hypnol 3% (Pentobarbital Sódico) na quantidade de 15 uL para cada 100 g do peso do rato. Após a retirada do sangue, este foi centrifugado para que fosse utilizado o seu plasma.

12 RESULTADOS E DISCUSSÃO

12.1 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO DA HRP NA RESPOSTA DO BIOSSENSOR

As enzimas imobilizadas possuem várias utilidades em biotecnologia e por isso numerosas técnicas de imobilização são desenvolvidas e podem ser aplicadas numa variedade de suportes. Imobilizar uma enzima em pasta de carbono é atraente uma vez que apresenta a possibilidade de controlar a quantidade de modificadores (enzima, cofator, mediador); rapidez de resposta devido à proximidade do material biocatalítico e à ausência de membranas que formam barreiras que impedem a difusão; facilidade de fabricação e renovação da superfície do eletrodo.

Quando um biossensor com enzima imobilizada é construído, o que se busca é manter a atividade da enzima e a livre difusão de substratos. Estes dois fatores dão ao processo de imobilização de enzimas uma importância fundamental visto que, durante o mesmo, podem acontecer mudanças no comportamento cinético das enzimas. Esta mudança de comportamento se dá devido aos efeitos estérico, conformacional, de transferência de massa, difusional e, também, os efeitos que o microambiente exerce sobre os parâmetros catalíticos intrínsecos da enzima (CRUMBLISS et al., 1994). É obvio que o limite de detecção depende não somente da relação sinal/ruído e de parâmetros como pH, potencial aplicado, entre outros, mas também da atividade da enzima imobilizada. Assim, para maximizar a sensibilidade do método, uma enzima altamente ativa e um eficiente método de imobilização devem ser empregados (YAROPLOV, 1995).

O procedimento de imobilização propicia a mudança de comportamento da enzima e parâmetros como temperatura ótima de reação e pH, podem ser alterados quando a enzima é imobilizada, ou seja, o ambiente enzimático na superfície do

eletrodo pode ser usado para melhorar as características do sensor. O tipo de suporte e o procedimento de imobilização podem alterar o microambiente do sítio ativo da enzima. Portanto, uma cuidadosa imobilização pode influenciar favoravelmente na atividade da enzima proporcionando respostas desejáveis.

Nesta etapa do trabalho, o objetivo principal foi investigar o efeito de diferentes composições da pasta de carbono na resposta do eletrodo. Na Tabela 1 são mostrados os valores de sensibilidade obtidos com a adição de glutaraldeído (GA), albumina de soro bovino (BSA) e a ativação da grafite com carbodiimida (GCDI) no processo de imobilização da enzima. Os resultados indicam que a composição da pasta tem grande influência na resposta do biossensor para serotonina. É possível verificar que as sensibilidades dos biossensores onde foi utilizada a carbodiimida (**B5-B8**) para ativar a grafite, são melhores.

Tabela 1 - Respostas dos biossensores à base de HRP na determinação de serotonina obtidas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0; 10 μmol L⁻¹ H₂O₂; E_{apl} = -50 vs ECS.

Método de imobilização	Sensibilidade (nA L μmol ⁻¹ cm ⁻²)
Adsorção física – B1	4 ± 2
Ligação cruzada com glutaraldeído – B2	37 ± 4
Oclusão com BSA – B3	77 ± 3
Glutaraldeído + BSA – B4	163 ± 4
Ligação covalente com carbodiimida – B5	13 ± 3
Carbodiimida + glutaraldeído – B6	57 ± 4
Carbodiimida + BSA – B7	151 ± 5
Carbodiimida + Glutaraldeído + BSA – B8	180 ± 6

A carbodiimida promove uma forte ligação entre a enzima e o eletrodo, de acordo com o que é mostrado esquematicamente na Figura 8. Primeiramente,

grupos carboxílicos do suporte reagem com a carbodiimida, em meio levemente ácido. Quando a grafite ativada é colocada na presença da enzima, grupos aminos da mesma acoplam com o biomaterial formando ligações amidas entre o suporte e a enzima.

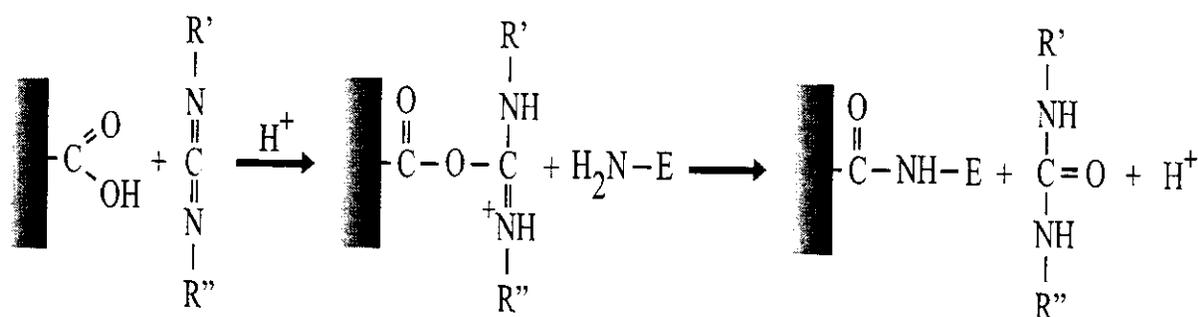


Figura 8 - Esquema da reação via carbodiimida usada para a formação de ligação covalente entre a enzima e o suporte (CHIBATA, 1978).

O uso de glutaraldeído juntamente com a carbodiimida (**B6**) confere ao biossensor uma boa sensibilidade. Este resultado está de acordo com os obtidos por Freire et al. (2001) quando avaliou diferentes imobilizações para a enzima lacase em eletrodos de fibra de carbono. Os autores atribuíram o aumento na sensibilidade a um efeito sinérgico no processo de imobilização: a ligação da enzima com o glutaraldeído que ocorre através do grupo amino da enzima e o grupo aldeído do glutaraldeído (Figura 9). O glutaraldeído promove boa reticulação aumentando a quantidade de enzima imobilizada por área, mas não é muito eficiente na fixação da mesma sobre a superfície do suporte. A combinação de carbodiimida e glutaraldeído proporciona boa fixação ao suporte e boa reticulação, resultando em um biossensor mais sensível que os obtidos quando se usam estes procedimentos separadamente.

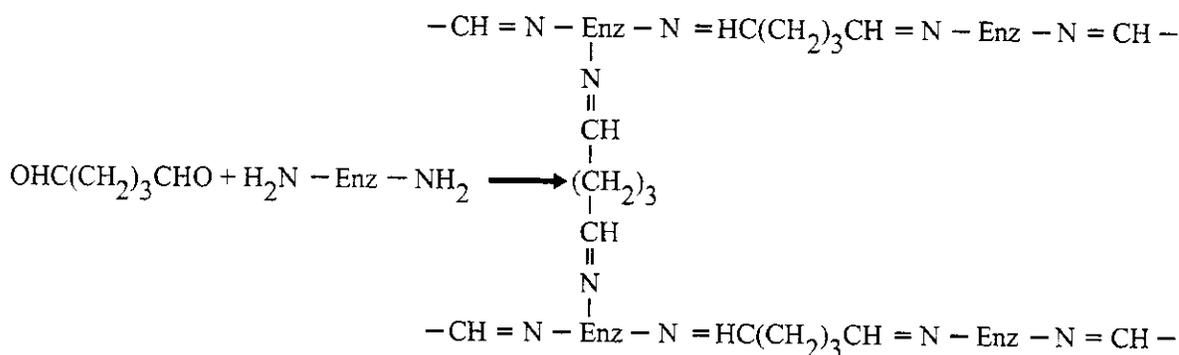


Figura 9 - Ligação cruzada envolvendo a reação entre o glutaraldeído e grupos aminos residuais livres da enzima (KENNEDY ; CABRAL, 1985).

Embora a utilização de glutaraldeído e carboiimida simultaneamente melhore a sensibilidade do biossensor, a adição de BSA parece ser o fator decisivo na questão do aumento da sensibilidade. Os biossensores que tiveram esta proteína incorporada ao processo de imobilização tiveram sua sensibilidade aumentada (**B3**, **B4**, **B7** e **B8**). Embora não seja estritamente necessária para a ligação cruzada, a BSA desempenha uma importante função pois aumenta a concentração total de proteína no sistema (Figura 10), fazendo com que haja uma estabilização da

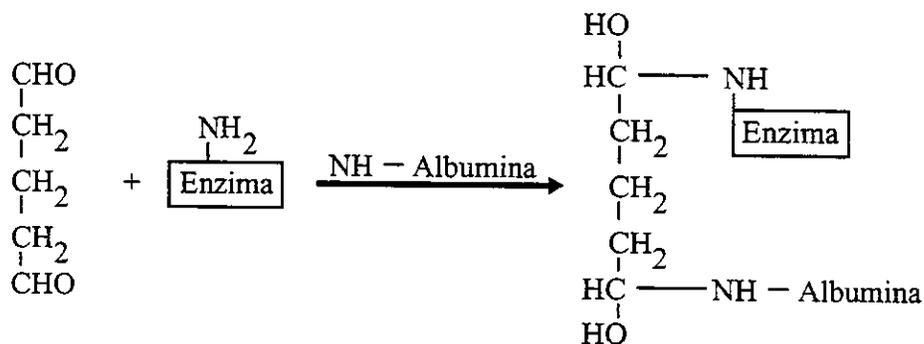


Figura 10 - Imobilização de enzima e albumina de soro bovino via glutaraldeído (GUILBAULT ; OLIVEIRA NETO, 1985).

enzima, uma vez que o ambiente se torna mais próximo ao natural da enzima (MAEHLY, 1955 ; JONSSON-PETTERSSON, 1991).

Molina et al. (1999) citam que a adição de BSA em eletrodo de pasta de carbono aumentou significativamente o sinal eletroquímico da oxidação do NADH e que estes resultados podem ser explicados pelo fato de que a adição de BSA aumenta a hidrofilicidade da superfície do eletrodo, melhorando a velocidade de transferência de elétrons. Do mesmo modo, Ortega et al. (1994), fazendo uso de um biossensor de pasta de carbono com tirosinase imobilizada, verificaram que a corrente catalítica para fenol e catecol aumenta quando a BSA é incorporada ao sistema.

A combinação de BSA, GA e CDI, (**B8**) indica claramente a ocorrência de um efeito sinérgico, em que a BSA promove um ambiente natural para a enzima, o GA fixa a enzima através de ligações covalentes cruzadas e a CDI promove a formação de ligação covalente entre grupos funcionais da enzima e a grafite. Este processo de imobilização é o que permite a construção de um biossensor mais sensível e, portanto, foi selecionado para o prosseguimento da investigação.

12.2 QUANTIDADE DE ENZIMA NA PASTA

A resposta de um biossensor é tipicamente dependente da quantidade de enzima ativa imobilizada (CHAUBEY ; MALHOTRA, 2002) de modo que na construção de um biossensor a quantidade de enzima utilizada deve ser suficiente para garantir a reação com o substrato. Uma grande quantidade da mesma pode causar limitações difusionais, uma vez que, com o sítio ativo da enzima menos exposto, a reação com o substrato pode ser dificultada. Assim, grandes quantidades

de enzima podem diminuir a resposta do biossensor e aumentar o seu tempo de resposta uma vez que este também depende do acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. A Figura 11 apresenta o gráfico das sensibilidades obtidas com os biossensores construídos com diferentes unidades de enzima por miligrama de grafite. É possível observar que a sensibilidade do biossensor melhora à medida que aumenta a quantidade de enzima na pasta. Este comportamento está de acordo com o esperado já que um aumento na concentração de enzima favorece um aumento na velocidade da reação enzimática. Mas uma quantidade maior que 1,8 U por miligrama de grafite não provocou uma grande alteração na sensibilidade do biossensor, possivelmente porque dificulta a difusão do substrato. É importante ressaltar que, após a otimização do pH, o perfil obtido para este ensaio foi o mesmo. Portanto, a quantidade adotada foi 1,8 U de enzima por miligrama de grafite, que oferece uma boa resposta.

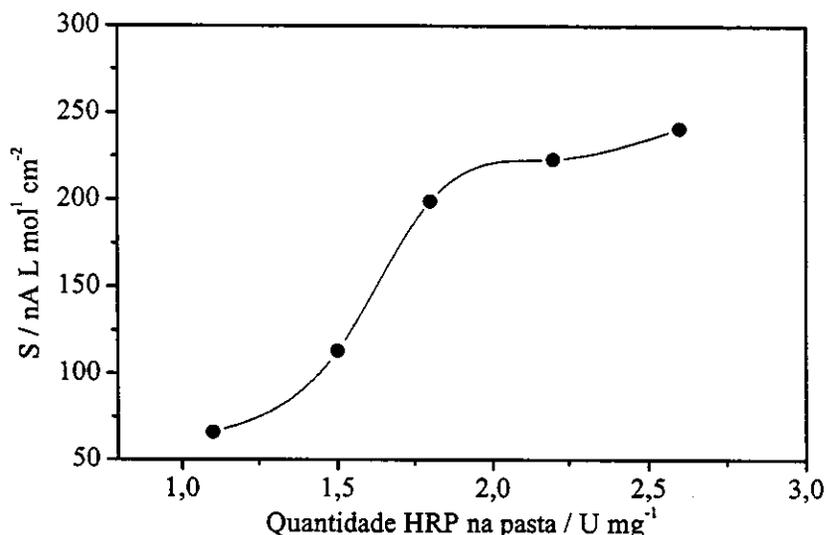


Figura 11 - Efeito da quantidade de HRP na sensibilidade do biossensor, obtida em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, $E_{\text{apl}} = -50 \text{ mV vs ECS}$, $10 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$.

12.3 QUANTIDADE DE GLUTARALDEÍDO

Uma das técnicas utilizadas na imobilização de enzimas é a imobilização por ligação covalente cruzada. Neste método ocorre a ligação entre moléculas da enzima, formando uma ampla estrutura tridimensional. A ligação cruzada envolve a formação de ligação covalente entre enzimas, utilizando para tal reagentes bi ou multifuncionais entre os quais o glutaraldeído. Embora existam grandes diferenças na composição do glutaraldeído que é comercializado e a sua tendência a se polimerizar quando mantido em temperatura ambiente, mudando a sua composição com o tempo, o que propicia dificuldades na sua utilização, ele é muito empregado para imobilizar enzimas devido à baixa toxicidade, simplicidade de manuseio e baixo custo. As ligações formadas entre a enzima e o glutaraldeído são irreversíveis e pouco sensíveis às variações de pH e temperatura.

A efetividade da imobilização da enzima com glutaraldeído depende diretamente das condições experimentais em que o procedimento é conduzido, devido à multiplicidade das estruturas químicas possíveis em cada situação (WALT ; AGAYN, 1994). Esta técnica propicia complexos de alta atividade e grande resistência à desnaturação. A maior desvantagem é que muitas enzimas são sensíveis à reação, perdendo a atividade catalítica. Assim, deve-se otimizar a quantidade de agente imobilizante para que o processo seja viável numa análise química. A Tabela 2 mostra as respostas obtidas para a serotonina, usando-se diferentes quantidades de glutaraldeído no processo de imobilização. O melhor resultado foi obtido quando são utilizados 6,0 μL de uma solução 5% (v/v) do reagente imobilizante. As respostas semelhantes observadas quando se utilizam 6,0 ou 7,5 μL de glutaraldeído no processo de imobilização podem ser devidas ao fato de este reagente promover um grau de reticulação da enzima semelhante em ambos

os casos, bloqueando da mesma forma o acesso do substrato ao centro ativo da mesma (FREIRE et al., 2001), o que provoca respostas sem diferenças significativas.

Os possíveis problemas que o uso do glutaraldeído viesse a acarretar foram contornados usando, em todos os experimentos, o mesmo frasco de reagente e com o cuidado de mantê-lo sempre sob refrigeração. As soluções diluídas utilizadas foram sempre recém-preparadas.

Tabela 2 - Efeito das quantidades de glutaraldeído na pasta sobre a resposta do biossensor, para uma concentração $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de serotonina e $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 , em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0, $E_{\text{apl}} = -50 \text{ mV vs ECS}$.

Quantidade de glutaraldeído(μL)	$\Delta j \text{ (nA cm}^{-2}\text{)}$
3,0	84 ± 2
4,5	125 ± 1
6,0	179 ± 2
7,5	174 ± 1
9,0	126 ± 1
10,5	95 ± 4

Solução de glutaraldeído 5% (v / v)

12.4 QUANTIDADE DE ALBUMINA DE SORO BOVINO

Os eletrodos à base de pasta de carbono oferecem a possibilidade de modificação de seu interior. A incorporação de aditivos cria um ambiente protetor

para a enzima, que pode resultar num aumento de sensibilidade e estabilidade. (POSPECU et al., 1995 ; AMINE ; KAUFFMANN, 1992).

A utilização de BSA no processo de imobilização tem por objetivo formar um ambiente mais próximo do ambiente natural da enzima (MAEHLY, 1955 ; JONSSON-PETTERSSON, 1991) fator que pode refletir num aumento da sensibilidade.

A Tabela 3 mostra as respostas obtidas para a serotonina, usando-se diferentes quantidades de BSA no processo de imobilização, sendo o melhor resultado obtido quando são utilizados 160 μL de uma solução 2,5 mg / mL desse reagente de imobilização. A diminuição do sinal com a maior quantidade de BSA na pasta pode ser devido a um aumento da resistência difusional ou a uma fixação rígida da enzima ou ainda devido a uma substituição da HRP pela BSA na superfície do biossensor (JONSSON-PETTERSSON, 1991).

Tabela 3 - Efeito das quantidades de BSA na pasta sobre a resposta do biossensor, para uma concentração 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de serotonina e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 , em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} e pH 7,0, $E_{\text{apl}} = -50 \text{ mV vs ECS}$.

Quantidade de BSA (μL)	Δj (nA cm^{-2})
80	99 ± 2
120	170 ± 2
160	180 ± 3
200	138 ± 4
240	64 ± 1

Solução de BSA de concentração 2,5 mg / mL em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} e pH 7,0.

12.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Sabe-se que uma alta concentração de H_2O_2 inibe a atividade da peroxidase, sendo então necessário otimizar a quantidade deste reagente de modo a garantir uma boa sensibilidade para o biossensor, sem que haja a formação de enzima inativa (ADEDIRAM, 1989 ; SERRA et al., 2001). Assim, a concentração de peróxido de hidrogênio foi investigada fazendo-se curvas analíticas para serotonina, com diferentes quantidades de peróxido .

Na Figura 12 é possível observar que, com o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio, a sensibilidade do biossensor aumenta, atingindo um valor máximo entre 13 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Entretanto, nestas concentrações, juntamente com o aumento da sensibilidade, houve um aumento da relação sinal/ruído. Portanto, foi escolhida a concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ que garante bons resultados e evita a formação de enzima inativa, fato que parece estar acontecendo quando a concentração de peróxido é 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

É importante salientar que, quando um eletrodo de pasta de carbono não modificado foi testado na detecção de serotonina na presença de H_2O_2 , sob as mesmas condições de otimização do biossensor proposto, praticamente nenhum sinal foi obtido (biossensores **B1** e **B5**, Tabela 1). Estes resultados eliminam a possibilidade de que o peróxido de hidrogênio estivesse oxidando o analito independentemente da presença de BSA ou glutaraldeído.

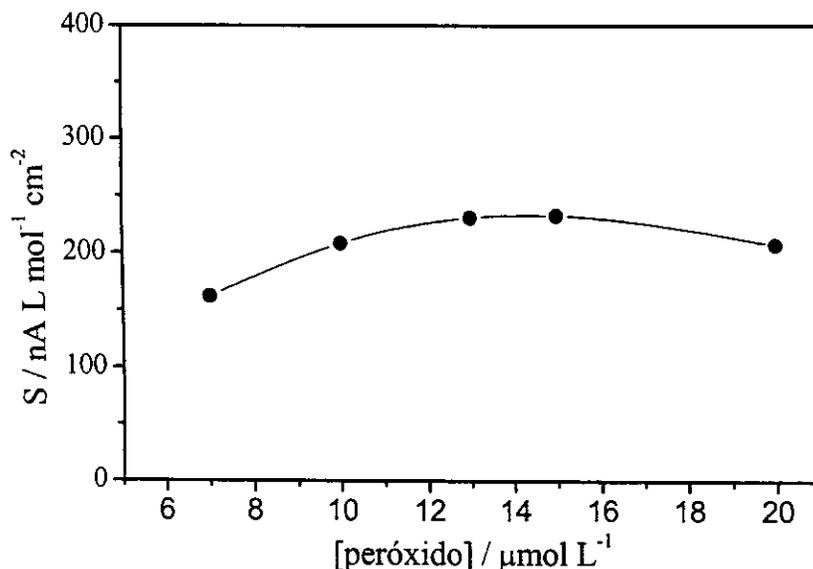


Figura 12 - Sensibilidade do biossensor em função das concentrações de peróxido, obtidas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, Ph $7,0$, $E_{\text{apl}} = -50 \text{ mV vs ECS}$.

12.6 EFEITO DO pH DA SOLUÇÃO TAMPÃO

O pH é um parâmetro crítico tanto para a atividade como para a estabilidade da enzima, e é sabido que o pH ótimo de uma enzima não é necessariamente idêntico ao pH de seu meio extracelular normal (BICKETSTAFF, 1997). A maioria das enzimas apresenta um pH característico onde a sua atividade é máxima. Acima ou abaixo deste pH, a atividade da enzima diminui, motivo pelo qual é importante a otimização do mesmo. De acordo com Ruzgas et al. (1996), a dependência do pH dos eletrodos modificados com peroxidase pode ser diferente para diferentes mediadores, uma vez que existem duas dependências de pH no ciclo catalítico da HRP. A etapa oxidativa, em que

ocorre a reação da enzima com o peróxido, é independente do pH no intervalo de 4,5 a 7,5. Na etapa redutiva, a reação de redução é dependente do pH do meio, mostrando uma transferência eletrônica mais eficiente em soluções ácidas, mas depende também do substrato a ser reduzido.

O efeito do pH da solução tampão sobre a resposta do biossensor em estudo é mostrado na Figura 13.

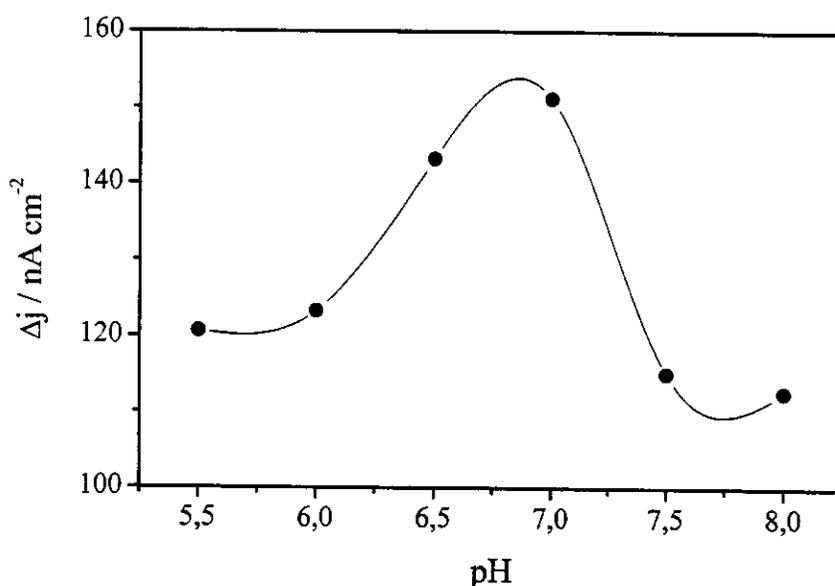


Figura 13 - Resposta do biossensor em função do pH da solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, para $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de serotonina, $E_{\text{apl}} = -50 \text{ mV vs ECS}$ e $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 .

É possível observar que a melhor resposta foi obtida em pH 7,0, que é o pH similar ao observado para a enzima solúvel (MAEHLI, 1955). Este comportamento demonstra que o processo de imobilização não afetou o pH ótimo para a atividade catalítica da peroxidase imobilizada, quando a serotonina foi usada como substrato. Os resultados mostram, também, que a resposta diminui mais

intensamente em meios mais básicos sugerindo que a cinética da enzima é mais afetada neste meio. Por esta razão, o pH da solução usado nos experimentos foi 7,0.

12.7 EFEITO DO POTENCIAL APLICADO

Uma vantagem a ser considerada no desenvolvimento de um biossensor amperométrico é a possibilidade de serem realizadas as medidas na faixa de potencial de $-0,2$ e 0 V vs ESC, pois nesta região o ruído e a corrente residual são baixos, o que facilita o estudo em baixas concentrações (MARKO-VARGA, 1995), de modo que o risco de ocorrerem reações eletroquímicas paralelas, quando se utiliza amostra real, é grandemente reduzido nesta faixa de potencial. Deve-se considerar também que o potencial aplicado possui grande influência na resposta do sensor pois o mesmo afeta tanto a sensibilidade quanto a seletividade do sistema (CSÖREGI, 1993). A influência do potencial aplicado na resposta do biossensor é mostrada na Figura 14, onde pode ser observado um aumento na sensibilidade do biossensor em potenciais mais negativos. Porém nestes potenciais a enzima pode ser desativada, lenta e irreversivelmente pela formação de um composto III (Fe^{6+}) da HRP (CSÖREGI, 1993). Deste modo, sendo a estabilidade operacional de um biossensor grandemente afetada pelo potencial de polarização, neste estudo o potencial foi fixado em -50 mV vs ECS porque o sinal obtido foi de boa intensidade, está menos exposto a interferentes e também evita a formação de enzima inativa.

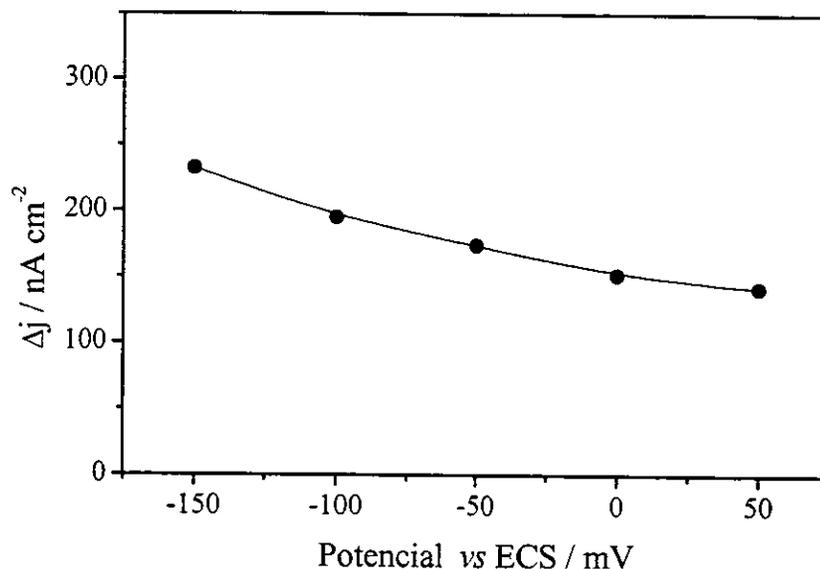


Figura 14 - Resposta do biossensor em função do potencial aplicado obtida em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 para $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de serotonina, $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 .

12.8 INFLUÊNCIA DA SOLUÇÃO TAMPÃO

A atividade enzimática depende não só do pH mas também do tipo de solução tampão, bem como de sua concentração, podendo mudar também a sua estabilidade (DIXON ; WEBB, 1979). Em geral, os estudos empregando eletrodos modificados com HRP usam o tampão fosfato (RUZGAS et al., 1995a, 1996 ; LINDGREN et al., 1997 ; MUNTEANU, 1998). Porém neste ensaio, além do tampão fosfato, as medidas eletroquímicas foram também realizadas em Pipes, Hepes e Tris, uma vez que os íons em solução podem interagir com a matriz alterando a resposta. Em toda a investigação foram mantidos os mesmos pH e concentração do tampão. A Tabela 4 mostra as sensibilidades obtidas para a serotonina usando os diferentes tampões, sendo o melhor resultado apresentado em tampão fosfato. Este comportamento provavelmente é devido à melhor facilidade

dos ânions fosfatos de se difundirem através do eletrodo de pasta de carbono, em comparação aos outros tampões investigados (ROSATTO et al., 1999). A menor sensibilidade apresentada pelo tampão Tris pode ser atribuída ao fato de ele conter grupos aminos que reagem com o glutaraldeído, diminuindo a resposta devido à adsorção na superfície do eletrodo (KOUDELKA-HELP et al., 1997).

Tabela 4 - Sensibilidade do biossensor em função do tipo de tampão utilizado, obtidas em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0. $E_{\text{apl}} -50 \text{ mV vs ECS}$ e $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$.

Tampão	Tris	Hepes	Pipes	Fosfato
Sensibilidade ($\text{nA L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$)	109 ± 3	188 ± 3	192 ± 4	200 ± 5

12.9 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO

A concentração da solução tampão pode influenciar na resposta do eletrodo. Desta forma, para a escolha da melhor concentração foram feitas curvas de calibração em tampão fosfato pH 7,0 nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2 mol L^{-1} . As sensibilidades obtidas estão listadas na Tabela 5. Observa-se que existe um aumento na sensibilidade por causa do aumento da concentração da solução tampão fosfato, indicando que quanto mais íons existirem no sistema, maior o transporte de carga e conseqüentemente melhor a resposta do eletrodo. A diminuição da sensibilidade do biossensor, quando se utilizou a concentração 0,2 mol L^{-1} , pode ser devida ao aumento da força iônica do meio que pode estar desnaturando a enzima. Portanto, foi escolhida a concentração de 0,1 mol L^{-1} para a

realização dos ensaios porque foi a concentração em que a sensibilidade do biossensor foi maior.

Tabela 5 - Valores de sensibilidade obtidos em diferentes concentrações de tampão fosfato pH 7,0, $E_{\text{apl}} = -50$ mV vs ECS e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 .

Concentração da solução tampão (mol L^{-1})	Sensibilidade ($\text{nA L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$)
0,025	132 ± 8
0,05	143 ± 5
0,1	202 ± 7
0,2	137 ± 4

12.10 CARACTERÍSTICAS DO SENSOR

12.10.1 Curva Analítica para Serotonina

Com as melhores condições estabelecidas foi obtida a curva de concentração vs resposta do biossensor, a qual fornece informações importantes como sensibilidade, intervalo linear de resposta, limite de detecção (CASS, 1990).

A curva analítica para serotonina (Figura 15), usando o biossensor desenvolvido, foi obtida aplicando o potencial de -50 mV vs ECS, em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e uma concentração fixa de peróxido de hidrogênio $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. A resposta foi linear entre $0,2$ e $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de serotonina ajustada pela equação $j = 3 (\pm 2) + 203 (\pm 2) [\text{serotonina}]$ com um coeficiente de correlação linear $0,9998$ para $n = 10$, onde a densidade da corrente é dada em nA cm^{-2} e a concentração de serotonina em $\mu\text{mol L}^{-1}$. O limite de

detecção, calculado para três vezes o sinal do ruído, foi de $0,08 \mu\text{mol L}^{-1}$.

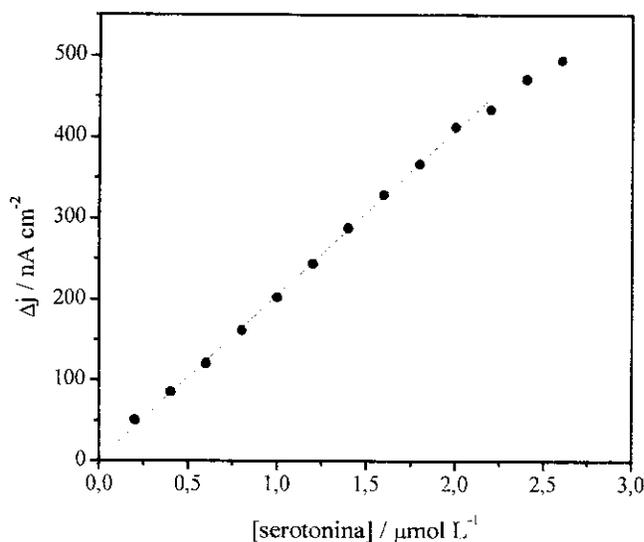


Figura 15 - Curva analítica obtida para serotonina usando o biossensor desenvolvido aplicando o potencial de -50 mV vs ECS , em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 com uma concentração de peróxido de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$

12.10.2 Constante de Michaelis – Menten

A constante de Michaelis–Menten (K_m^{ap}) representa a afinidade da enzima pelo substrato e quanto menor o seu valor, maior a afinidade, refletindo na sensibilidade. Seu valor pode ser calculado utilizando-se o método gráfico de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) (DIXON ; WEBB, 1979). Neste método, o valor da constante é fornecido a partir de uma concentração fixa de um substrato e variando-se a concentração do segundo substrato até um valor limite que

corresponde a um comportamento de saturação. Para o biossensor desenvolvido, o valor de K_m^{ap} calculado foi de $3,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, isto sugere que a enzima HRP possui grande afinidade aparente com a serotonina na presença de H_2O_2 . Na literatura (SERRA et al., 2001) foram encontrados valores de K_m^{ap} na ordem de $10^{-5} \text{mol L}^{-1}$ para biossensores com HRP imobilizada utilizados na determinação de compostos fenólicos.

12.10.3 Tempo de Resposta

O tempo de resposta de um biossensor está relacionado com a reação química entre a enzima e o substrato e é a etapa limitante do processo. A agitação da solução afeta tanto a velocidade de transferência de massa do substrato para o eletrodo quanto a transferência de massa do produto da reação para fora do eletrodo. Assim, a velocidade e o tempo de agitação da solução foram mantidos sob controle. O tempo de resposta, considerando o tempo no qual a resposta é máxima, para este biossensor foi aproximadamente 0,5 s. Este tempo de resposta é muito curto considerando que o eletrodo é à base de pasta de carbono.

12.10.4 Repetibilidade na Construção dos Sensores

A avaliação da repetibilidade na construção dos biossensores foi feita analisando-se os valores de sensibilidades obtidos em seis biossensores desenvolvidos. Na Tabela 6 estão os resultados obtidos, sendo a repetibilidade avaliada pelo cálculo do desvio padrão médio relativo (r.s.d.), obtendo-se o valor

de 2 %. Os valores indicam que os biossensores são construídos com boa repetibilidade.

Tabela 6 - Sensibilidades obtidas para seis biossensores desenvolvidos, utilizados na caracterização do biossensor.

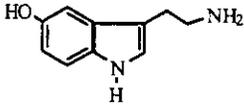
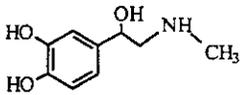
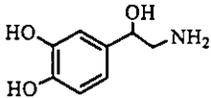
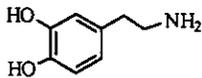
Biossensores	Sensibilidade (nA L μmol^{-1} cm ⁻²)
01	202
02	200
03	196
04	207
05	197
06	203
Sensibilidade <small>média</small>	201 \pm 4

12.11 ESTUDO DE DIFERENTES NEUROTRANSMISSORES

Embora a resposta do biossensor tenha sido otimizada em função da serotonina, é evidente que o mesmo pode detectar outros compostos monofenólicos e catecólicos (Figura 7). Além do mais, sabe-se que a sensibilidade obtida para monofenóis, usando biossensor à base de peroxidase, é menor do que as obtidas para compostos difenólicos (ROSATTO et al., 1999, 2002). Entre os compostos catecólicos, as catecolaminas, dopamina, epinefrina e norepinefrina podem ser detectadas. Portanto, na análise de uma amostra real, este biossensor pode fornecer a quantidade total de aminas biogênicas (5-HT, DA, EP e NE) contidas na amostra e que pode ser detectada pelo eletrodo proposto. Assim, as características do biossensor foram estudadas para os outros neurotransmissores aqui citados e são

mostradas na Tabela 7. Para melhor comparação foi utilizada, em todos os casos, a mesma faixa linear da serotonina, neurotransmissor usado na otimização dos dados.

Tabela 7 - Parâmetros analíticos para o biossensor desenvolvido na presença de diferentes neurotransmissores, obtidos em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, E_{apl} = -50 vs ECS

Neurotransmissor	Estrutura	Faixa linear (μmol L ⁻¹)	Sensibilidade (nA L μmol ⁻¹ cm ⁻²)	Limite de detecção (μmol L ⁻¹)	Potencial Redox ^a (mV)
Serotonina		0,2 – 2,0	203 ± 5 (r=0,9998; n=10)	0,08	350
Epinefrina		0,2 – 2,0	225 ± 6 (r=0,9978; n=10)	0,09	242
Norepinefrina		0,2 – 2,0	229 ± 4 (r=0,9987; n=10)	0,16	306
Dopamina		0,2 – 2,0	234 ± 4 (r=0,9986; n=10)	0,18	190

^a Valores de potencial vs ECS, obtidos usando um eletrodo não modificado de pasta de carbono em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0.

Em termos de sensibilidade, foram obtidas respostas semelhantes para epinefrina, norepinefrina e dopamina, o que é perfeitamente compreensível uma vez que estas substâncias possuem estruturas químicas muito semelhantes. Considerando os potenciais redoxes, obtidos em eletrodo não modificado de pasta

de carbono, cuja ordem é $DA < EP < NE < 5\text{-HT}$ (Tabela 7), poder-se-ia esperar que a norepinefrina apresentasse uma sensibilidade menor que a encontrada, pois compostos com potenciais mais elevados são mais dificilmente oxidados e, de acordo com o mecanismo do biossensor, devem apresentar respostas menos sensíveis. Assim, a resposta obtida para a serotonina está de acordo com o esperado, levando em conta seu potencial redox e também por ser um monofenol.

É importante ressaltar que, apesar das aminas biogênicas serem eletroativas em eletrodos de pasta de carbono não modificados, nas condições de otimização para o biossensor proposto, não foram obtidas respostas para nenhum dos analitos estudados em eletrodo não modificado. Por outro lado, é conhecido que, em eletrodos não modificados, existe grande probabilidade de a superfície do eletrodo ser passivada por produtos de polimerização dos compostos fenólicos envolvidos na reação. Esta situação pode ser minimizada ou eliminada quando são usados eletrodos quimicamente modificados, entre eles os biossensores enzimáticos.

12.12 ESTABILIDADE

O estudo da estabilidade é um dos maiores problemas a serem resolvidos, ou pelo menos contornados, nas pesquisas com biossensores. Nas condições otimizadas, o sensor proposto apresentou-se estável durante quatro horas de uso contínuo (Figura 16), motivando a continuidade dos estudos quando, então, poderá ser utilizado em análises de um sistema em fluxo.

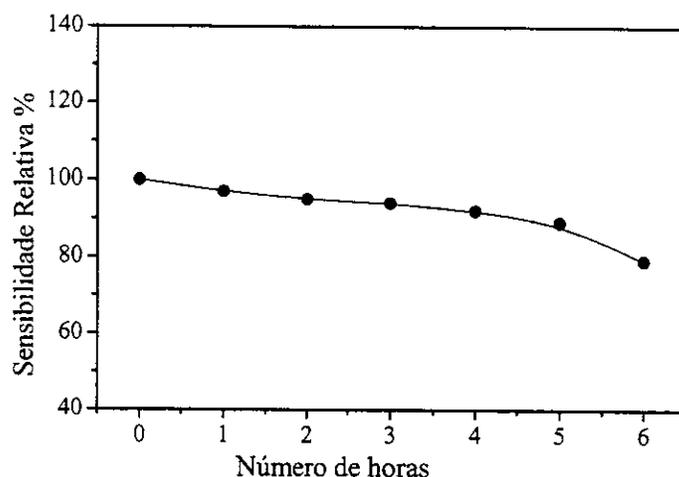


Figura 16 - Teste de estabilidade realizado com uma concentração de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de serotonina, aplicando um potencial de -50 mV vs ECS , em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e concentração de peróxido de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$

12.13 EFEITO DE ADITIVOS NA SENSIBILIDADE E ESTABILIDADE DO BIOSENSOR

A sensibilidade do biossensor proposto foi muito boa, atingindo o objetivo inicial que foi produzir um dispositivo com sensibilidade suficiente para ser utilizado em amostras reais, principalmente para análise de serotonina, onde a concentração deste neurotransmissor é muito baixa. Entretanto, a estabilidade não foi tão boa, problema que pode acontecer em biossensores à base de enzimas e que é possível ser contornado devido aos progressos alcançados nas técnicas de imobilização enzimática e também com a introdução de aditivos que possam estabilizar a enzima (POSPECU et al., 1995).

Sabendo que o sucesso de um biossensor como instrumento analítico depende da velocidade com que a enzima é desativada, e considerando que o eletrodo proposto apresentou uma estabilidade relativamente baixa, nesta etapa do

trabalho são apresentados os resultados do estudo da incorporação de alguns aditivos à pasta de carbono, com o objetivo de melhorar o tempo de vida do biossensor sem perder ou melhorando a sensibilidade.

Foi estudada, então, a influência dos aditivos PEI, DNA e do sistema estreptavidina-biotina (ST/BIOTINA) sobre a sensibilidade e estabilidade operacional do biossensor para neurotransmissores.

A Figura 17 mostra uma comparação das sensibilidades obtidas com os biossensores propostos nesta etapa do estudo, sem e com o aporte de aditivos.

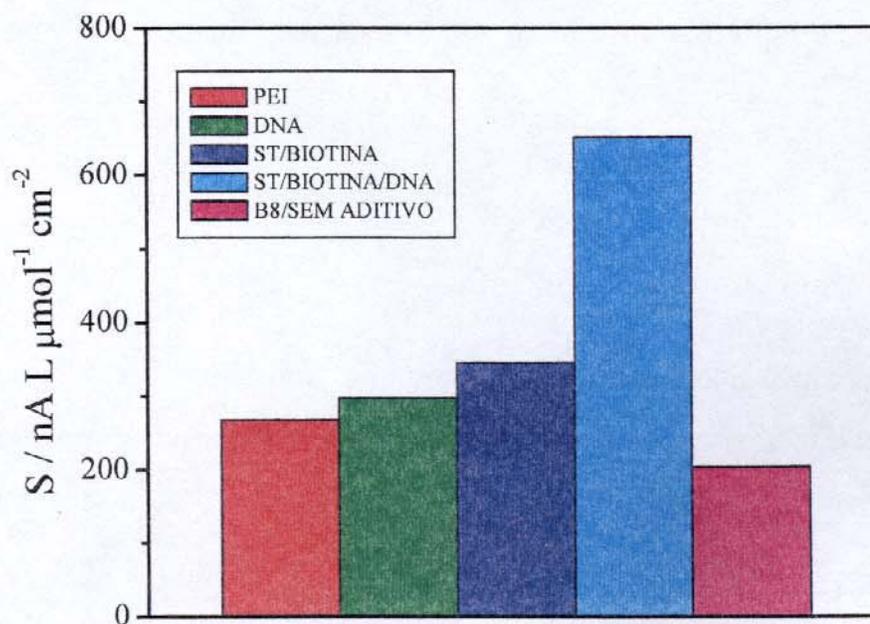


Figura 17 - Comparação das sensibilidades dos biossensores preparados sem e com o acréscimo de aditivos. Respostas obtidas nas mesmas condições mencionadas na Figura 15.

Verifica-se que, com o uso do sistema ST/BIOTINA/DNA, houve uma grande melhora na sensibilidade do biossensor. Este comportamento indica que, provavelmente, o sistema ST/BIOTINA permite que um maior número de sítios

ativos da enzima participe da reação catalítica. Em relação à presença de DNA, este aumento de sensibilidade é explicável pela natureza condutora da fita de DNA, o que facilitaria a transferência de elétrons, como discutem em seu artigo Rosatto et al. (2001). Além do mais, o DNA pode proporcionar um ambiente mais hidrofílico para a enzima favorecendo a catálise (DANTONI et al., 1998).

Em relação à estabilidade, com a adição de aditivos houve uma pequena melhora que permitiu que as pastas guardadas em geladeira pudessem ser utilizadas por cinco dias consecutivos, com a manutenção da sensibilidade.

12.14 ESTUDO DE INTERFERENTES

Apesar da especificidade da enzima, algumas substâncias podem interferir e afetar a resposta dos biossensores quando estes são usados em amostras biológicas, que podem possuir espécies oxidáveis na superfície do eletrodo. Os ácidos ascórbico e úrico são alguns dos compostos que são eletroquimicamente oxidados quando se aplicam baixos potenciais. Existem duas reações possíveis para que ocorra a interferência: eles podem sofrer oxidação na superfície do eletrodo ou podem reagir com o peróxido adicionado, diminuindo a resposta do sensor. Para que fosse possível um estudo mais criterioso, os ensaios para avaliar a interferência dos ácidos úrico e ascórbico foram realizados utilizando-se o biossensor ST/BIOTIN/DNA, que apresentou melhor sensibilidade.

Nas condições estabelecidas para o biossensor ST/BIOTINA/DNA utilizado, na proporção de 1 : 0,25 (serotonina : interferente) não houve interferência dos ácidos ascórbico e úrico.

12.15 AVALIAÇÃO DO BIOSSENSOR EM AMOSTRA REAL

O biossensor ST/BIOTINA/DNA foi testado na determinação total de aminas biogênicas em amostras de soro sanguíneo de rato. Na Tabela 8 são mostrados os valores obtidos em relação a serotonina.

Tabela 8 - Valores de concentração de aminas biogênicas, determinados em amostras de soro sanguíneo de rato, obtidos com o biossensor proposto.

Número da amostra	Média das Concentrações de Aminas Biogênicas ($\mu\text{mol L}^{-1}$)*
01	0,21 \pm 0,01
02	0,32 \pm 0,03
03	0,21 \pm 0,02
04	0,17 \pm 0,03
05	0,22 \pm 0,03

*Desvio padrão para três replicatas

Para avaliar o efeito da matriz, na Tabela 9 são mostrados os resultados obtidos na recuperação de sete amostras diferentes. Os resultados mostram que o biossensor proposto pode ser aplicado em análise de amostras biológicas pois a matriz exerce pouca influência.

Tabela 9 - Valores de recuperação determinados, em amostras de soro sanguíneo de rato, usando o biossensor proposto, com a adição de $0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de serotonina como padrão.

Número da amostra	Recuperação (%)
01	105 \pm 2
02	103 \pm 6
03	97 \pm 6
04	104 \pm 2
05	105 \pm 4
06	96 \pm 2
07	102 \pm 3

Considerando a faixa linear que o biossensor apresentou, o mesmo pode ser aplicado na determinação de serotonina em sangue humano cujos níveis normais estão entre 0,5 e 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (CALBREATH, 1992).

Com este resultado pode-se dizer que o biossensor proposto apresenta-se como uma alternativa viável para a determinação de neurotransmissores.

13 CONCLUSÕES

A determinação de neurotransmissores (ou aminas biogênicas) em amostras biológicas tem como grande desafio a sensibilidade da metodologia utilizada. Neste sentido, foram desenvolvidos oito biossensores e os resultados obtidos mostraram que o processo de imobilização da enzima possui um papel fundamental na sensibilidade do biossensor. A utilização de albumina de soro bovino, glutaraldeído e carbodiimida propiciaram um biossensor com boa sensibilidade, podendo ser feitas determinações de serotonina na faixa de 0,2 a 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, demonstrando que a pasta de carbono foi uma ótima matriz para a incorporação destes reagentes de imobilização. Os demais neurotransmissores aqui estudados também tiveram boa resposta na faixa linear estudada.

Além da boa sensibilidade alcançada, o biossensor proposto apresenta vantagens como a facilidade de preparação, superfície facilmente renovável, limite de detecção de 0,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$, baixo tempo de resposta, sendo a resposta máxima alcançada em 0,5 s, e alta repetibilidade.

Embora as medidas tenham sido realizadas em estados estacionários, a estabilidade do biossensor foi relativamente baixa, sendo necessária a troca da pasta de carbono e também da solução após cada ensaio realizado. No entanto, a configuração do sensor desenvolvido possibilitou a incorporação de aditivos na pasta. Os estudos realizados neste sentido permitiram verificar que o sistema ST/BIOTINA/DNA promoveu um grande aumento na sensibilidade do biossensor proposto, além da utilização da pasta por cinco dias, quando não em uso e guardada em geladeira, com manutenção da resposta.

A sensibilidade do biossensor e a sua estabilidade após quatro horas de uso contínuo, são características bastante promissoras para a sua utilização em sistemas em fluxo.

Os bons resultados obtidos permitem concluir que o sistema de imobilização da HRP utilizado é altamente conveniente para a preparação deste tipo de biossensor, permitindo a sua utilização na determinação de neurotransmissores em amostras de soro sanguíneo de rato e abrem a possibilidade de realizar a quantificação de serotonina e/ou aminas biogênicas total em amostras de sangue humano, o que é de grande utilidade considerando que mudanças nas concentrações de neurotransmissores no organismo servem como indicador de doenças e seus prognósticos.

A capacidade das técnicas analíticas para miniaturização e o seu comprovado sucesso em tecnologias híbridas fazem do biossensor desenvolvido neste estudo uma alternativa potencial aos métodos existentes para análise de neurotransmissores.

14 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Como perspectivas de trabalhos futuros sugere-se:

- Utilizar sistemas em fluxo empregando o biossensor amperométrico para neurotransmissores;
- Empregar filmes poliméricos, como por exemplo Nafion®, para melhorar a seletividade;
- Estudar novas formas de imobilização que possam estabilizar a estrutura conformacional da enzima;
- Construir biossensores miniaturizados que possam ser utilizados em monitoramento *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ADEDIRAN, S. A. ; LAMBEIR, A. M. Kinetics of the reaction of compound II of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide to form compound III. *Eur. J. Biochem.*, v. 186, p. 571, 1989.
- ALEGRET, S. ; CÉSPERES, F. ; MARTINEZ-FÀBREGAS, E. ; MARTORELI, D.; MORALES, A. Carbon-polymer biocomposites for amperometric sensing. *Biosen. Bioeletron.*, v. 11, p. 35, 1996.
- AMINE, A. ; KAAUFFMANN, J. Preparation and characterization of a fragile enzyme immobilized carbon paste electrode. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, v. 28, p. 117, 1992.
- BANCI, L. Structural properties of peroxidases. *J. Biotechnol.*, v. 53, p. 253, 1997.
- BARKER, S. A. Título. In: TURNER, A. P. F. ; KARUBE, I. ; WILSON, G. S. *Biosensors: fundamentals and applications*. New York : Oxford University Press, 1987. Cap. 6, p. 85.
- BICKETSTAFF, G. *Immobilization of enzymes and cells methods in Biotechnology*. New Jersey : Humana Press, 1997. Cap 1.
- BURESTEDT, E. ; NARVAEZ, A. ; RUZGAS, T. ; GORTON, L. ; EMNÈUS, J. ; DOMINGUES, E. ; MARKO-VARGA, G. Rate-limiting steps of tyrosinase-modified electrodes for the detection of catechol. *Anal. Chem.*, v. 68, p. 1605, 1996.
- CALBREATH, D. F. *Clinical chemistry : a fundamental textbook*. Philadelphia : W. B. Saunders Company, 1992. Cap. 16, p. 339.
- CASS, A. E. G. *Biosensor: a practical approach*. New York : Oxford University Press, 1990. p. 14.

- CHAN, E. C. Y. ; WEE, P. Y. ; HO, P. C. High-performance liquid chromatographic assay for catecholamines and metanephrines using fluorimetric detection with pre-column 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride derivation. *J. Chromatogr. B*, v. 749, p. 179, 2000.
- CHAUBEY, A. ; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, v. 1, p. 441. 2002.
- CHEN, D. ; ZHAN, D. Z. ; CHENG, C. W. ; LIU, A. C. ; CHEN, C. Determination of urine catecholamines by capillary electrophoresis with dual-electrode amperometric detection. *J. Chromatogr. B*, v. 750, p. 33, 2001.
- CHIBATA, I. *Immobilized enzymes research and development*. New York : Wiley, 1978. p. 47.
- COHEN, G. D. *O cérebro no envelhecimento humano*. São Paulo : Organizações Audrei, 1995. Cap. 2.
- COSNIER, S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. a review. *Biosens. Bioelectron.*, v.14, p. 443, 1999.
- COSNIER, S.; INNOCENT, C.; ALLIEN, L.; POITRY, S.; TSACOPOULOS, M. An electrochemical method for making enzyme microsensors. Application to the detection of dopamine and glutamate. *Anal. Chem.*, v. 69, p. 968, 1997.
- CRESPI, F. ; MOBIUS, C.; NEUDECK, A. Short-range differential-pulse voltametry for fast, selective analysis of basal levels of cerebral compounds in-vivo. *J. Neurosc. Meth.*, v. 50, p. 225, 1993.
- CRESPI, F. ; WRIGHT, I. K. ; MOBIUS, C. Isolation rearing of rats alters release of 5-hydroxytryptamine and dopamine in the frontal-cortex – an in vivo electrochemical study. *Exp. Brain Res.*, v. 88, p. 495, 1992.

- CRUMBLISS, A. L. ; STONEHUERNER, J. ; HENKENS, R. W. ; O'DALY, J. P. ; ZHAO, J. The use of inorganic materials to control or maintain immobilized enzyme activity. *New J. Chem.*, v.18, p. 337, 1994.
- CSOREGI, E. ; JONSSON-PETTERSSON, G. ; GORTON, L. Mediatorsless electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at graphite electrodes chemically modified with peroxidases. *J. Biotechnol.*, v. 30, p. 315, 1993.
- CUNNINGHAM, A. J. *Introduction to bioanalytical sensor*. New York : John Wiley and Sons, INC. by Wiley-Interscience Puplication, 1998. Cap. 1.
- DANTONI, P. ; SERRANO, S. H. P. A. ; BRETT, M. O. ; GUTZ, I. R. Flow-injection determination of catechol with a new tyrosinase/DNA biosensor. *Anal. Chim. Acta*, v. 366, p. 137, 1998.
- DARAIN, F. ; PARK, S. ; SHIM, Y. Disposable amperometric immunosensor system for rabbit IgG using a conducting polymer modified screen-printed electrode. *Biosen. Bioeletron.*, v. 18, p. 773, 2003.
- DAVIS, J. ; VAUGHAN, D. H. ; CARDOSI, M. F. Elements of biosensor construction. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 17, p. 1030, 1995.
- DIXON, M. ; WEBB, E. C. *Enzymes*. 3. ed. New York : Academic Press, 1979.
- DUNFORD, H. B. Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. In: EVERSE, J. ; EVERSE, K. E. ; GRISHAM, M. B. *Peroxidases in chemistry and biology*. Local : CRC Press, 1991. v. 2, cap. 1, p. 1.
- FOGT, E. Continuous ex vivo and in vivo monitoring with chemical sensors. *Clin. Chem.*, v. 36, p. 1573, 1990.
- FOLKES, L. K. ; CANDEIAS, L. P. Interpretation of the reactivity of peroxidase compounds I and II with phenols by the Marcus equation. *FEBS Lett.*, v. 412, p. 305, 1997.

- FORZANI, E. S. ; RIVAS, G. A. ; SOLÍS, V. M. Amperometric determination of dopamine on vegetal-tissue enzymatic electrodes. Analysis of interferents and enzymatic selectivity. *J. Electroanal. Chem.*, v. 435, p. 77, 1997.
- FOTOPOULOU, M. A. ; IOANNOU, P. C. Post-column terbium complexation and sensitized fluorescence detection for the determination of norepinephrine, epinephrine and dopamine using high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, v. 462, p. 179, 2002.
- FREIRE, R. S. ; DURAN, N. ; KUBOTA, L. T. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. *Talanta*, v. 54, p. 681, 2001.
- FREW, J. E. ; HILL, H. O. A. Electrochemical biosensors. *Anal. Chem.*, v. 59, p. 993A, 1987.
- GHINDILIS, A. ; ATANASOV, P. ; WILKINS, E. Enzyme-catalyzed direct electron transfer: fundamentals and analytical applications. *Electroanalysis*, v. 9, p. 661, 1997.
- GIBSON, T. D. Biosensors: the stability problem. *Analisis*, v. 27, p. 630, 1999.
- GORTON, L. ; CSOREGI, E. ; DOMÍNGUEZ, E. ; EMNÉUS, J. ; JÖNSSON-PETTERSSON, G. ; MARKO-VARGA, G. ; PERSSON, B. Selective detection in flow analysis based on the combination of immobilized enzymes and chemically modified electrodes. *Anal. Chim. Acta*, v. 250, p. 203, 1991.
- GORTON, L. Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells. *Electroanalysis*, v. 7, p. 23, 1995.
- GORTON, L. ; JÖNSSON-PETTERSSON, G. ; CSOREGI, E. ; JOHANSSON, K. ; DOMINGUES, E. ; MARKO-VARGA, G. Amperometric biosensors based on an apparent direct electron transfer between electrodes and immobilized peroxidases. *Analyst*, v. 117. p. 1235, 1992.

- GORTON, L. ; LINDGREN, A. ; LARSSON, T. ; MUNTEANU, F. D. ; RUZGAS, T. ; GAZARYAN, I. Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. *Anal. Chim. Acta*, v. 400, p. 91, 1999.
- GROSSI, G. ; BARGOSSO, A.; SPROVIERI, G.; BERNAGOZZI, V. ; PASQUALI, R. Full automation of serotonin determination by column-switching and HPLC. *Chromatographia*, v. 30, p. 61, 1990.
- GUARDIA, M. D. L. Biochemical sensors: the state of the art. *Mikrochim. Acta*, v. 120, p. 243, 1995.
- GUILBAULT, G.G. *Analytical uses of immobilized enzymes*. New York : Marcel Dekker, Inc., 1984. Cap. 3, p. 112.
- GUILBAULT, G. G. ; OLIVEIRA NETO, G. In: WOODWARD, J. *Immobilized cells and enzymes*. Oxford: IRL Press, 1985. Cap. 5, p. 55.
- GUO, L.H. ; HILL, H. A. O. Direct electrochemistry of proteins and enzymes. *Adv. Inorg. Chem.*, v. 36, p. 341, 1991.
- GUYTON, A. C. *Tratado de fisiologia médica*. 9. ed. Local: Guanabara Koogan, 1997.
- HABERMULLER, K. ; MOSBACH, M. ; SCHUHMANN, W. Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 366, p. 560, 2000.
- HELLER, A. Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes. *J. Phys. Chem.*, v. 96, p. 3579, 1992.
- HENDRY, S. P. Amperometric biosensors. *J. Biotechnol.*, v. 15, p. 229, 1990.
- HOSHI, T. ; ANZAI, J. ; OSA, T. Controlled deposition of glucose oxidase on platinum electrode based on na avidin/biotin system for the regulation of output current of glucose sensors. *Anal. Chem.*, v. 67, p. 770, 1995.

- IKEDA, T. Electrochemical biosensors based on biocatalyst electrodes. *Bull. Electrochem.*, v. 8, p. 145, 1992.
- IVNITSKI, D. ; ABDEL-HAMID, I.; ATANASOV, P.; WILKINS, E. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosens. Bioelectron.*, v. 14, p. 599, 1999.
- JACKSON, B. P.; Dietz, S. M. ; WIGHTMAN, R. M. Fast-scan cyclic voltammetry of 5-hydroxytryptamine. *Anal. Chem.*, v. 67, p. 1115, 1995.
- JONSSON-PETTERSSON, G. Reagentless hydrogen peroxide and glucose sensors based on peroxidase immobilized on graphite electrodes. *Electroanalysis*, v. 3, p. 741, 1991.
- KALCHER, K. ; KAUFFMANN, J.M. ; WANG, J. ; SVANCARA, I. ; VYTRAS, K. ; NEUHOLD, C. ; YANG, Z. *Electroanalysis*, v. 7, p. 5, 1995.
- KOUDELKA-HELP, M. ; ROOIJ, N. F. ; STRIKE, D. J. In: BICKETSTAFF, G. *Immobilization of enzymes and cells methods in biotechnology*. New Jersey : Humana Press, 1997. Cap. 10.
- LASKIN, A. I. *Enzymes and immobilized cells in biotechnology*. London : Cummings, 1985. Cap.10.
- LEHNINGER, A. L. *Princípios de bioquímica*. 5. ed. São Paulo : Sarvier, 1989. Cap. 9.
- LEITE, O. D. ; FATIBELLO FILHO, O. ; BARBOSA, A. M. Determination of catecholamines in pharmaceutical formulations using a biosensor modified with a crude extract of fungi laccase (*pleurotus ostreatus*). *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 14, p. 297, 2003a.
- LEITE, O. D. ; LUPERTTI, K. O. ; FATIBELLO FILHO, O. ; VIEIRA, I. C. ; BARBOSA, A. M. Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. *Talanta*, v. 59, p. 889, 2003b.

- LINDGREN, A. ; EMNÉUS, J. ; RUZGAS, T. ; GORTON, L. ; MARKO-VARGA, G. Amperometric detection of phenols using peroxidase-modified graphite electrodes. *Anal. Chim. Acta*, v. 347, p. 51, 1997.
- LINDGREN, A.; RUZGAS, T. ; GORTON, L. ; CSÖREGI, E. ; ARDILA, G. B. ; SAKHAROV, I. Y. ; GAZARYAN, I. Biosensors based on novel peroxidases with improved properties in direct and mediated electron transfer. *Biosen. Bioelectron.*, v. 15, p. 491, 2000.
- LISDAT, F. ; WOLLENBERGER, U. ; MAKOWER, A. ; HÖRTNAGL, H. ; PFEIFFER, D. ; SCHELLER, F. W. Catecholamine detection using enzymatic amplification. *Biosen. Bioelectron.*, v. 12, p. 1199, 1997.
- LISDAT, F. ; WOLLENBERGER, U. ; PAESCHKE, M. ; SCHELLER, F. W. Sensitive catecholamine measurement using a monoenzymatic recycling system. *Anal. Chim. Acta*, v. 368, p. 233, 1998.
- LOTZBEYER, T. ; SCHUHMANN, W. ; SCHMIDT, H. L. Electron transfer principles in amperometric biosensors: direct electron transfer between enzymes and electrode surface. *Sens. Actuat. B*, v. 33, p. 50, 1996.
- LUONG, J. H. T. ; MULCHANDANI, A. ; GUILBAULT, G.G. Developments and applications of biosensors. *Trends in BioTechnology*, v. 6, p. 310, 1988.
- LUTZ, E. S. M. ; BURESTEDT, E. ; EMNÉUS, J. ; LIDÉN, H. ; GORTON, L. ; MARKO-VARGA, G. Effects of different additives on a tyrosinase based carbon paste electrode. *Anal. Chim. Acta*, v. 305, p. 8, 1995.
- MAEHLI, A. C. Plant peroxidase. *Methods in Enzymol.*, v. 2, p. 801, 1955.
- MALHOTRA, B. D. ; CHAUBEY, A. Biosensors for clinical diagnostics industry. *Sensors and Actuators B*, v. 91, p. 117, 2003.
- MARKO-VARGA, G. ; EMNÉUS, J. ; GORTON, L. ; RUZGAS, T. Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds. *Trends Anal. Chem.*, v. 14, p. 319, 1995.

- MARUSZAK, W. ; TROJANOWICZ, M. ; MARGASINSKA, M.;
ENGELHARDT, H. Application of carboxymethyl- β -cyclodextrin as a chiral selector in capillary electrophoresis for enantiomer separation of selected neurotransmitters. *J. Chromatogr. A*, v. 926, p. 327, 2001.
- MASCINI, M.; PALCHETTI, I. ; MARRAZZA, G. DNA electrochemical biosensors. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 369, p. 15, 2001.
- McKENZIE, J. M. ; WATSON, C. J. ; ROSTAND, R. D. ; GERMAN, I. ; WITOWSKI, S. R. ; KENNEDY, R. T. Automated capillary liquid chromatography for simultaneous *J. Chromatogr. A*, v. 962, p. 105, 2002.
- MELLO, L. D. ; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, v. 77, p. 237, 2002.
- MESSING, R. A. Adsorption and inorganic bridge formations. *Methods Enzymol.*, v. 44, p. 148, 1976.
- MIYAZAKI, K. ; MATSUMOTO, G. ; YAMADA, M. ; YASUI, S. ; KANEKO, H. Simultaneous voltametric measurement of nitrite ion, dopamine, serotonin with ascorbic acid on the GRC electrode. *Electrochim. Acta.*, v. 44, p. 3809, 1999.
- MOLINA, C. R. ; BOUJTITA, M. ; MURR, N. E. A carbon paste electrode modified by entrapped toluidine blue-O for amperometric determination of L-lactate. *Anal. Chim. Acta*, v. 401, p. 155, 1999.
- MOSES, P. R. ; WIER, P. ; MURRAY, R. W. Chemically modified tin oxide electrode. *Anal. Chem.*, v. 47, p. 1882, 1975.
- MOUSTY, C. ; BERGAMASCO, J. ; WESSEL, R. ; PERROT, H. ; COSNIER, S. Elaboration and characterization of spatially controlled assemblies of complementary polyphenol oxidase - alkaline phosphatase activities on electrodes. *Anal. Chem.*, v. 73, p. 2890, 2001.
- MUNTEANU, F. D. ; LINDGREN, A. ; EMNÉUS, J. ; GORTON, L. ; RUZGAS, T.; CSÖREGI, E. ; CIUCU, A. ; HUYSTEE, R. B. ; GAZARYAN, I. G. ;

- LAGRIMINI, L. M. bioelectrochemical monitoring of phenols and aromatic amines in flow injection using novel plant peroxidases. *Anal. Chem.*, v. 70, p. 2596, 1998.
- OLIVEIRA NETO, G. ; YAMANAKA, H. Enzimas e materiais biológicos imobilizados: biossensores. *Quím. Nova*, v. 11, p. 432, 1988.
- ONI, J. ; NYOKONG, T. Simultaneous voltammetric determination of dopamine and serotonin on carbon paste electrodes modified with iron (II) phthalocyanine complexes. *Anal. Chim. Acta*, v. 434, p. 9, 2001.
- ORTEGA, F. ; DOMÍNGUEZ, E. ; BURESTEDT, E. ; EMNÉUS, J. ; GORTON, J. ; MARKO-VARGA, G. Phenol oxidase-based biosensors as selective detection units in column liquid chromatography for the determination of phenolic compounds. *J. Chromatogr. A*, v. 675, p. 65, 1994.
- PALOP, S. G. ; ROMERO, A. M. ; CALATAYUD, J. M. Oxidation of adrenaline and noradrenaline by solvated molecular oxygen in a FIA assembly. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 27, p. 1017, 2002.
- PANHOLZER, T. J. ; BEYER, J. ; LICHTWALD, K. Coupled-column liquid chromatographic analysis of catecholamines, serotonin, and metabolites in human urine. *Clin. Chem.*, v. 45, p. 262, 1999.
- PANTANO, P. ; KUHR, W. G. Dehydrogenase-modified carbon-fiber microelectrodes for the measurement of neurotransmitter dynamics. 2. Covalent modification utilizing avidin-biotin technology. *Anal. Chem.*, v. 65, p. 623, 1993.
- PEREIRA, A. C. ; SANTOS, A. S. ; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Quím. Nova*, v. 25, p. 1012, 2002.
- PHADKE, R. S. Biosensors and enzyme immobilized electrodes. *BioSystems*, v. 27, p. 203, 1992.

- POSPECU, I. C. ; ZETTERBERG, G. ; GORTON, L. Influence of graphite powder, additives and enzyme immobilization procedures on a mediatorless HRP-modified carbon paste electrode for amperometric flow-injection detection of H₂O₂. *Biosens. Bioelectron.*, v. 10, p. 443, 1995.
- RAGGI, M. A. ; SABIONI, C. ; CASAMENTI, G. ; GERRA, G. ; CANALOGHI, N. ; MASOTTI, L. Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B*, v. 730, p. 201, 1999.
- RANG, H. P. ; DALE, M. M. ; RITTER, J. M. *Farmacologia*. 3. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1997. Cap. 25.
- ROGERS, K. R. ; WILLIAMS, L. R. Biosensors for environmental monitoring: a regulatory perspective. *Trends Anal. Chem.*, v. 14, p. 289, 1995.
- ROSATTO, S. S. ; KUBOTA, L. T. ; OLIVEIRA NETO, G. Biosensor for phenol based on the direct electron transfer blocking of peroxidase immobilising on silica-titanium. *Anal. Chim. Acta*, v. 390, p. 65, 1999.
- ROSATTO, S. S. ; OLIVEIRA NETO, G. ; KUBOTA, L. T. Effect of DNA on the peroxidase based biosensor for phenol determination in waste waters. *Electroanalysis*, v. 13, p. 1, 2001.
- ROSATTO, S. S. ; SOTOMAYOR, P. T. ; KUBOTA, L. T. ; GUSHIKEM, Y. SiO₂/Nb₂O₅ sol-gel as a support for HRP immobilization in biosensor preparation for detection. *Electrochim. Acta.*, v. 47, p. 4451, 2002.
- RUAN, C. ; LI, Y. Detection of zeptomolar concentrations of alkaline phosphatase based on a tyrosinase and horse-radish peroxidase bienzyme biosensor. *Talanta*, v. 54, p. 1095, 2001.
- RUBIANES, M. D. ; RIVAS, G. A. Highly selective dopamine quantification using a glassy carbon electrode modified with a melanin-type polymer. *Anal. Chim. Acta*, v. 440, p. 99, 2001.

- RUZGAS, T. ; CSOREGI, E. ; EMNÉUS, J. ; GORTON, L. ; MARKO-VARGA, G. Peroxidase-modified electrodes: fundamentals and application. *Anal. Chim. Acta*, v. 330, p. 123, 1996.
- RUZGAS, T. ; EMNÉUS, J. ; GORTON, L. ; MARKO-VARGA, G. The development of a peroxidase biosensor for monitoring phenol and related aromatic compounds. *Anal. Chim. Acta*, v. 311, p. 245, 1995a.
- RUZGAS, T. ; GORTON, L. ; EMNÉUS, J. ; MARKO-VARGA, G. Kinetic models of horseradish peroxidase action on a graphite electrode. *J. Electroanal. Chem.*, v. 391, p. 41, 1995b.
- SCOUTEN, W. H. ; LOUNG, J. H. T. ; BROWN, R. S. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *Tibtech.*, v. 13, p. 178, 1995.
- SERRA, B. ; BENITO, B. ; AGÜÍ, L. ; REVIEJO, A. J. ; PINGARRÓN, J. M. Graphite-teflon-peroxidase composite electrochemical biosensors. A tool for the wide detection of phenolic compounds. *Electroanalysis*, v.13, p. 693, 2001.
- SLINGERLAND, R. J. ; KUILENBURG, A. B. P. V. ; BODLAENDER, J. M. ; OVERMARS, H. ; VOÛTE, P. A. ; GENNIP, A. H. V. High-performance liquid chromatographic analysis of biogenic amines in cells and in culture media using on-line dialysis and trace enrichment. *J. Chromatogr. B*, v. 716, p. 65, 1998.
- SOTOMAYOR, M. D. P. T. ; TANAKA, A. A. ; KUBOTA, L. T. Development of an enzymeless biosensor for determination of phenolic compounds. *Anal. Chim. Acta*, v. 455, p. 215, 2002.
- STRADIOTTO, N. R. ; YAMANAKA, H. ; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 14, p. 159, 2003.

- SZEPONIK, J. ; MÖLLER, B. ; PFEIFFER, D. ; LISDAT, F. ;
WOLLENBERGER, U. ; MAKOWERT, A. ; SCHELLERT, F. W. Ultrasensitive
bienzyme sensor for adrenaline. *Biosens. Bioelectron.*, v.12, p. 947, 1997.
- THEVENOT, D. R. ; TOTH, K. ; DURST, R. A. ; WILSON, G. S. Electrochemical
biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.*, v.
16, p. 121, 2001.
- TSAI, T. H. ; CHEN, C. F. In vivo microdialysis determination of collagen-
induced serotonin release in rat blood. *J. Chromatogr. A*, v. 730, p. 121, 1996.
- UPDIKE, S. J. ; HICKS, G.P. The enzyme electrode. *Nature*, v. 214, p. 986, 1967.
- VALLE, L. B. S. ; OLIVEIRA FILHO, R. M. ; DeLUCIA, R. ; OGA, S.
Farmacologia integrada: fundamentos farmacológicos da terapêutica. Rio de
Janeiro : Atheneu, 1991. v.2, p.27.
- VO-DINH, T. ; CULLUM, B. Biosensors and biochips: advances in biological and
medical diagnostics. *Frezenius J. Anal. Chem.*, v. 366, p. 540, 2000.
- WALT, D. R. ; AGAYN, V. The chemical of enzyme and protein immobilization
with glutaraldehyde. *Trends Anal. Chem.*, v. 13, p. 425, 1994.
- WANG, H. Y. ; SUN, Y. ; TANG, B. Study on fluorescence property of dopamine
and determination of dopamine by fluorimetry. *Talanta*, v. 57, p. 899, 2002.
- WANG, J. Sol-gel materials for electrochemical biosensors. *Anal. Chim. Acta*, v.
399, p. 21 , 1999c.
- WANG, J. Electroanalysis and biosensors. *Anal. Chem.*, v. 71, p. 71, 1999b.
- WANG, J. *Analytical electrochemistry*. Local :VCH Publishers, Inc., 1994.
Cap. 5.
- WANG, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a
review. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 19, p. 47, 1999a.

- WEI, M. ; LI, M. ; LI, N. ; GU, Z. ; DUAN, X. Electrocatalytic oxidation of norepinephrine at a reduced C₆₀-[dimethyle-(β-cyclodextrin)]₂ and Nafion chemically modified electrode. *Electrochim. Acta.*, v. 47, p. 2673, 2002.
- WILSON, G. S. In: TURNER, A. P. F. ; KARUBE, I. ; WILSON, G.S. *Biosensors: fundamentals and applications*. New York : Oxford University Press, 1987. Cap.11, p.165.
- WOLLENBERGER, U.; NEUMANN, B. Quinoprotein glucose Dehydrogenase modified carbon paste electrode for the detection of phenolic compounds. *Electroanalysis*, v. 9, p. 366, 1997.
- WOODWARD, J. *Immobilized cells and enzymes*. Oxford : IRL Press, 1985.
- WORSFOLD, P. J. Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes – technical report. *Pure Appl. Chem.*, v. 67, p. 597, 1995.
- XU, F. ; GAO, M. ; SHI, G. ; WANG, L. ; ZHANG, W. ; XUE, J. ; JIN, L. ; JIN, J. Simultaneous detection of monoamines in rat striatal microdialysate by high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, v. 439, p. 239, 2001.
- YAROLOV, A. I. ; KHARYBIN, A. N. ; EMNÉUS, J. ; MARKO-VARGA, G.; GORTON, L. Flow-injection analysis of phenol at a graphite electrode modified with co-immobilised laccase and tyrosinase. *Anal. Chim. Acta*, v. 308, p. 137, 1995.
- ZANINI, A. C. ; OGA S. *Farmacologia aplicada*. 5. ed. São Paulo : Atheneu, 1994. Cap. 21 e 26.
- ZEN, J.M. ; CHEN, I. L. ; SHIH, Y. Voltametric determination of serotonin in human blood using a chemically modified electrode. *Anal. Chim. Acta*, v. 369, p. 103, 1998.
- ZHANG, S. ; WRIGHT, G. ; YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosen. Bioeletron.*, v. 15, p. 273, 2000.