

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES PARA
DETERMINAÇÃO DE SALICILATO E GLICOSE**

TESE DE DOUTORADO

BENJAMIN GONÇALVES MILAGRES

CAMPINAS

1996



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

Milagres, Benjamin Gonçalves

M589d Desenvolvimento de biossensores para determinação de salicilato e glicose. / Benjamin Gonçalves Milagres. -- Campinas, [SP : s.n.], 1996.

Orientador: Graciliano de Oliveira Neto.

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

1. Biossensor. 2. Salicilato. 3. Glicose. I. Oliveira Neto, Graciliano. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Quimica. III. Título.

000000 IQ
000000 17
M 389L
Q24663
000000 17
P 000000 X
P 000000 05
P 000000 03/05/96
P 000000

CM-00087555-2

AGRADECIMENTOS

- Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, em especial ao setor de Química Analítica, pela oportunidade concedida para a realização do curso de doutorado;
- Ao programa CAPES/PICD, pela bolsa concedida;
- Aos funcionários da Assessoria de Treinamento da U.F.V, pela orientação no encaminhamento do processo de saída;
- Aos professores Osvaldo E. S. Godinho e Luiz M. Aleixo, pela amizade e atenção;
- Ao prof. Lauro T. Kubota, pela convivência republicana e pelos valiosos debates sobre o trabalho;
- À doutora Neuci, pelo fornecimento das amostras de soro e valiosa orientação no manuseio das mesmas;
- Aos funcionários da Biblioteca, Mecânica, Vidraria e Xerox, do Instituto de Química, pela amizade e ajuda profissional;
- Ao Mário(mecânica) e ao Marcos(vidraria) pelas sugestões ;
- À Luciane, meu agradecimento especial pela ajuda competente nos procedimentos técnicos;
- A todos os colegas, pela convivência no período que estive na UNICAMP;
- Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a feitura deste trabalho.

- Ao Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto, pela orientação, compreensão e incentivo nos momentos de dificuldades.

- Aos meus pais,

Evaristo Gonçalves da Silva (in memória)
Maria José das Mercês;

pela minha existência e meu mundo.

Aos meus irmãos e Maria Helaine que, cada um a seu modo contribuíram,
enormemente, para a realização deste trabalho.

Título: DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES PARA
 DETERMINAÇÃO DE SALICILATO E GLICOSE.

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver novas técnicas para construção de biossensores. Inicialmente, desenvolveu-se um biossensor para determinação de salicilato em fármacos, após apropriada hidrólise da amostra e sua conveniente diluição.

Utilizou-se a eletropolimerização para obtenção de filme de polipirrol, dopado com hexacianoferrato, sobre o qual colocou-se o glutaraldeído, como reagente de ligação cruzada para imobilização da enzima salicilato hidroxilase (EC. 1.14.13.1.). Os dois filmes foram suportados sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo, cerca de 20mm² de área. A faixa linear de resposta amperométrica para salicilato foi entre 10 e 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a um potencial aplicado de 150 mV vs ECS. O tempo de resposta foi de quarenta segundos. Uma boa correlação de resultados foi verificada entre aqueles obtidos com o biossensor e o método colorimétrico padrão. O estudo foi realizado com diferentes amostras de fármacos comumente usados como antitérmicos.

Desenvolveu-se, em seguida, um biossensor para glicose, tendo como objetivo sua utilização em determinações de glicose em amostras de soro sanguíneo. Para tal, construiu-se um eletrodo de pasta de carbono modificado, com o mediador ácido ferroceno monocarboxílico e a enzima glicose oxidase (EC 1.1.3.4) imobilizados em sílica gel enxertada com TiO_2 . A faixa linear de resposta amperométrica do biossensor para glicose foi entre $1,0 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , a um potencial aplicado de 340mV vs ECS. O tempo de resposta do biossensor foi de 15 segundos.

A determinação de glicose em soro sanguíneo mostrou excelente correlação com o método do "KIT" comercializado pela Merck. O material contendo a enzima imobilizada apresentou uma ótima estabilidade, mantendo a atividade enzimática, por no mínimo, seis meses.

ABSTRACT

The objective of this work was develop new techniques for biosensors construction. First of all a biosensor for salicylate determination in drugs, after appropriate hydrolysis and dilution, was developed.

A polypyrrol film, obtained by electropolymerization dopped with hexacyanoferrate over which, a film of glutaraldehyde was added for enzyme salicylate hidroxylase (EC 1.14.13.1), immobilization. Both films were supported on carbon glassy electrode surface, approximately 20mm² . The biosensor showed a linear range of response for salicylate between 10 and 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$, at 150 mV vs SCE. The response time was 40 seconds. It was found a good correlation for the results obtained by the biosensor and standard colorimetric method, in the assay of differents samples of antithermic drugs.

In a second step, a biosensor for glucose determination, in samples of blood serum, was developed. For that, a modified carbon paste electrode was built, by using the glucose oxidase (EC.1.1.3.4) and ferrocene monocarboxylic acid, immobilized on silica gel-TiO₂.

The biosensor showed a linear range of response between 1.0×10^{-4} and 7.0×10^{-4} mol L⁻¹, applying a

potential of 340 mV vs SCE. The response time was 15 seconds. The determination of glucose in blood serum using the biosensor, showed a good correlation with the Merck "Kit" method. The immobilized enzyme showed an excellent stability, keeping its activity for at least six months.

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
CAPÍTULO I.....	05
Enzimas como Reagentes Analíticos.....	05
I.1. Introdução.....	06
I.2. Princípio da Cinética Enzimática.....	07
I.3. Modelo de Michaelis - Menten.....	07
I.4. Atividade Enzimática.....	09
I.4.1. Unidade de Atividade Enzimática.....	11
I.5. Fatores que Afetam a Atividade Enzimática....	13
I.5.1. Efeito da Concentração do Substrato.....	13
I.5.2. Efeito da Concentração da Enzima.....	14
I.5.3. Efeito da Temperatura.....	15
I.5.4. Efeito do pH.....	16
I.5.5. Efeito do Cofator Enzimático.....	16
I.5.6. Efeito de Ativadores e Inibidores.....	17
I.5.6.1. Ativadores.....	17
I.5.6.2. Inibidores.....	18
I.5.7. Efeito da força Iônica.....	18
I.6. Imobilização Enzimática.....	19
I.6.1. Oclusão.....	19
I.6.2. Micrencapsulação.....	20

I.6.3.	Adsorção.....	20
I.6.4.	Ligação Covalente com o Suporte.....	21
I.6.5.	Ligação Covalente Cruzada.....	21

CAPÍTULO II.....	25
BIOSENSORES.....	25

II.1.	Introdução.....	26
II.2.	Conceito de Biossensor.....	27
II.2.1.	Biossensor Amperométrico ^x	28
II.3.	Construção de Um Biossensor.....	30
II.3.1.	Uso de Membrana na Fixação do Material Biológico.....	30
II.3.2.	Adsorção.....	30
II.3.3.	Ligação Covalente com uma Matriz Insolúvel....	31
II.3.4.	Eletropolimerização.....	32
II.4.	Dopagem do Filme de Polipirrol.....	34

CAPÍTULO III.....	36
Parte Experimental.....	36

III.1.	Reagentes.....	37
III.2.	Equipamentos.....	38
III.3.	Construção do Biossensor para Salicilato....	39
III.4.	Sistemática para Obtenção do Filme de Polipirrol.....	39
III.4.1.	Limpeza do Eletrodo de Carbono Vítreo.....	39
III.4.2.	Modificação do Eletrodo de Carbono Vítreo....	40

III.4.3.	Imobilização da Enzima Salicilato Hidroxilase	41
III.5.	Preparo das Amostras de Comprimidos.....	42
III.6.	Construção do Biossensor para Glicose.....	43
III.6.1.	Preparo da Sílica/Titânio.....	43
III.6.2.	Imobilização da Mediador e da Glicose Oxidase	45
III.6.3.	Caracterização da Sílica Modificada.....	46
III.6.4.	Análise Química do Biossensor de Glicose.....	47
III.7.	Célula Eletroquímica.....	48

CAPÍTULO IV.....	50
Biossensor para Salicilato.....	50

IV.1.	Importância da Determinação de Salicilato....	51
IV.2.	Métodos para Determinação de Salicilato.....	52
IV.2.1.	Métodos Espectrofotométricos.....	52
IV.2.2.	Métodos Potenciométricos.....	53
IV.2.3.	Outros Métodos não Enzimáticos.....	55
IV.3.	Métodos Enzimáticos.....	55
IV.3.1.	Enzima na Forma Solúvel.....	56
IV.3.2.	Enzima na Forma Imobilizada.....	56
IV.4.	Resultados e Discussão.....	58
IV.4.1.	Oxidação Catalítica do NADH.....	68
IV.4.2.	Eletrocatálise do Catecol.....	72
IV.4.3.	Influência da Quantidade de NADH.....	78
IV.5.	Determinação de Salicilato com o Biossensor..	80
IV.6.	Caracterização do Biossensor.....	81
IV.6.1.	Efeito do pH.....	81
IV.6.2.	Efeito da Temperatura.....	83

IV.6.3.	Tempo de Resposta do Biossensor.....	83
IV.6.4.	Estabilidade do Biossensor.....	85
IV.6.5.	Obtenção da Curva Padrão.....	85
IV.7.	Aplicação Analítica do Biossensor.....	88
IV.7.1.	Análise de Amostras de Comprimidos.....	88
IV.8.	Conclusões.....	90

CAPÍTULO V.....92

Biossensor para Glicose.....92

V.1.	Importância da Determinação de Glicose.....	93
V.2.	Métodos para Detrminação de Glicose.....	95
V.3.	Reação da Glicose Catalisada pela Enzima.....	96
V.4.	Eletrodo Pasta de Carbono.....	97
V.5.	Mediador Eletroquímico para Biossensor de Glicose.....	98
V.6.	Biossensor Pasta de Carbono para Glicose....	99
V.7.	Resultados e Discussão	100
V.7.1.	Estudo das Propriedades Redox da STFc.....	100
V.7.2.	Influência do Eletrólito Suporte.....	102
V.7.3.	Efeito da Concentração do Eletrólito	104
V.7.4.	Estabilidade do Sensor.....	108
V.7.5.	Efeito do pH.....	109
V.8.	Atividade Catalítica do Biossensor.....	110
V.8.1.	Tempo de Resposta do Biossensor.....	113
V.8.2.	Limitação Difusional do Sistema.....	115
V.9.	Estabilidade do Biossensor.....	118
V.10.	Curva Padrão para Glicose.....	118

V.11.	Análise de Amostras de Soro Sangüíneo.....	121
V.12.	Conclusões.....	122
V.13.	Perspectivas de Trabalhos Futuros.....	123
Referências Bibliográficas		124
Apêndice 1.....		134
Curriculum Vitae.....		135

INTRODUÇÃO GERAL

Eletrodo quimicamente modificado(**EQM**) ou de superfície modificada (**ESM**), são denominações aplicadas aos eletrodos que possuem espécies imobilizadas em sua superfície, sendo a imobilização realizada de maneira proposital. O conceito e desenvolvimento destes sensores foram inicialmente estudados por Moses e colaboradores¹.

Eletrodos de ouro, platina , carbono vítreo e grafite têm sido os mais usados para estudar o comportamento eletroquímico destas modificações. Entre os menos usuais, estão os eletrodos de carbono vítreo reticulado, polímero condutor e vidros condutores.

Esta é uma área relativamente nova e de grande interesse dos pesquisadores nos diversos campos da ciência. Essa assertiva pode ser avaliada pelo espaço obtido na literatura especializada, pelos assuntos relacionados com a modificação de superfície de eletrodo e a sua importância em eletroanalítica.

O primeiro artigo de revisão sobre o assunto foi apresentado por Heineman e Kissinger², em 1978. No ano seguinte, Snell e Keenan³ publicaram outro importante artigo sobre o mesmo assunto, discutindo as diferentes técnicas utilizadas para modificação de eletrodos e as principais aplicações.

Murray⁴ e seu grupo de pesquisa escreveram uma extensa revisão sobre o desenvolvimento das técnicas de modificação de superfície de eletrodo, em 1984. O autor apresentou uma visão geral e discutiu os diferentes aspectos das técnicas de modificação de eletrodos.

Dentre os métodos para modificação de eletrodo, destacam-se os que permitem colocar espécies mediadoras de elétrons sobre uma base condutora⁵⁻⁶. Uma alternativa de grande interesse consiste na colocação de filmes poliméricos finos sobre os mais diferentes suportes condutores⁷⁻⁹.

Diversas técnicas são usadas para colocação de filmes finos na superfície de um eletrodo, como a derivatização de superfícies metálicas e a colocação de filmes poliméricos⁶. Filmes poliméricos obtidos por eletropolimerização têm se destacado na obtenção de eletrodo modificado devido à versatilidade e facilidade de reproduzir a dopagem dos mesmos¹⁰⁻¹³. Especial atenção tem sido dada aos estudos de dopagem que permitem a incorporação de mediadores e/ou material biológico, visando a construção de biossensores¹⁴⁻¹⁸.

Carbono na forma de grafite é um material de baixo custo, fácil manuseio, resposta voltamétrica estável, que fornece correntes residuais baixas e faixa de potencial anódico ampla, sendo apropriado para construção de eletrodos quimicamente modificados na forma de pasta de carbono¹⁹.

Recentemente, foi publicado por Kalcher²⁰ e colaboradores um artigo de revisão sobre o uso de pasta de carbono em análises eletroquímicas. As técnicas eletroquímicas revisadas são a voltametria, amperometria e potenciometria e abrange o período de 1990 a 1993.

Outra recente revisão sobre o uso de pasta de carbono na construção de biossensores foi apresentada por Gorton²¹.

Recentemente²², foi mostrada a possibilidade de imobilização de mediadores como hidroximetil ferroceno, sobre a superfície de carbono vítreo ou platina. O sistema é inicialmente obtido com uma reação entre a superfície do eletrodo e TiCl_4 .

Outras publicações mostram o emprego da sílica gel ou zeólito como suporte inerte que pode ser usado para imobilizar mediadores de elétrons e modificar eletrodos de pasta de carbono²³⁻²⁵.

A disponibilidade dos mais diferentes sensores modificados aliada à evolução dos processos de obtenção de enzimas, com alto grau de pureza, permitem, hoje, a construção e a utilização de biossensores para diversas determinações analíticas.

Mundialmente, o biossensor mais comercializado é para determinação de glicose, sendo que outros biossensores de grande interesse em diversas áreas, também já estão sendo avaliados²⁶⁻²⁷, em termos de aceite comercial.

O uso de biossensor para monitorar demanda bioquímica de oxigênio, pesticidas, fenóis, metais pesados e poluição gasosa, no meio ambiente é revisado em recente artigo²⁸.

Com estes fatos em mente e dentro da linha de pesquisa do laboratório de eletroanalítica do IQ-UNICAMP, esta tese, teve como objetivos o desenvolvimento de biossensores para análise de dois analitos de grande interesse da área médica e industrial: **glicose** e **salicilato**.

O presente trabalho será apresentado em cinco capítulos, sendo que no primeiro, será descrito a parte relacionada com o uso de enzimas como reagentes analíticos, no segundo, uma visão geral sobre biossensores, no terceiro, a parte experimental, no quarto, o biossensor para determinação de salicilato, no quinto o biossensor para determinação de glicose e por último, serão apresentadas as perspectivas de trabalhos futuros.

Capítulo I

ENZIMAS COMO REAGENTES ANALÍTICOS

I.1. INTRODUÇÃO

Definem-se enzimas como catalisadores químicos de origem biológica, sintetizadas pelos organismos vivos e que agem sobre uma multiplicidade de reações envolvidas nas atividades celulares²⁹. As enzimas mais bem caracterizadas bioquimicamente são moléculas proteicas grandes, cuja massa molecular é da ordem de $1,0 \times 10^4$ a $2,0 \times 10^6$ unidades de massa molecular, que têm pelo menos uma conformação tridimensional. São geralmente estáveis em condições biológicas de temperatura e pH. Pequenas mudanças nas estruturas conformacionais podem provocar diminuição da atividade biológica, ou mesmo a perda total e irreversível de seu poder catalisador. Estas mudanças podem ser provocadas por efeitos físicos e/ou químicos, pela destruição de pontes de hidrogênio e outras ligações tipo forças de Van Der Waals e outros fatores envolvidos na conformação da enzima.

Muitas enzimas são produzidas na forma pura e cristalina, sendo que algumas podem ser adquiridas de diferentes fornecedores, como por exemplo, a lactato dehidrogenase que é comercializada por cerca de vinte fabricantes.

A Enzimologia sistemática começou a ser divulgada no século XIX, com procedimentos de purificação e determinação de estruturas protéicas. Hoje, cerca de 600 substâncias são determinadas via processos

enzimáticos^{21,30}. Vale ressaltar que em vários procedimentos enzimáticos os resultados obtidos são melhores em termos de seletividade e sensibilidade. A seletividade pode ser alcançada, até mesmo em alguns casos de isômeros. A sensibilidade, por outro lado, pode chegar níveis da ordem de nanogramas, mais comumente, de microgramas por litro.

Serão descritos a seguir alguns conceitos fundamentais sobre as propriedades das reações enzimáticas, o que ajudar no entendimento do trabalho.

I.2. PRINCÍPIO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA

O estudo cinético de reações enzimáticas é fundamentado nos conceitos básicos de reações químicas.

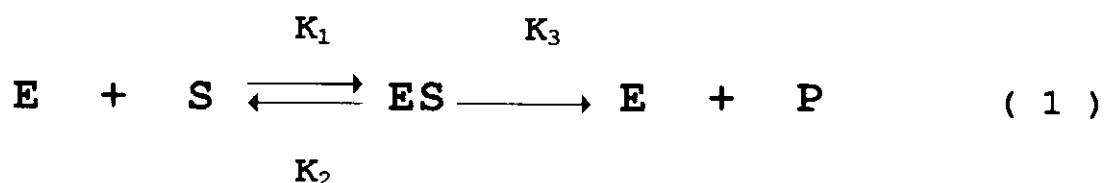
As transformações energéticas são feitas por moléculas enzimáticas que obedecem às leis da termodinâmica e da cinética.

As enzimas aceleram as reações pelo decréscimo da energia de ativação de Gibbs (ΔG^*), promovendo uma combinação com o substrato e levando a um novo caminho cuja energia de ativação do estado de transição é menor em relação àquele sem a participação da enzima.

I.3. MODELO DE MICHAELIS-MENTEN

Pela proposta de Michaelis-Menten, a enzima (**E**), inicialmente combina com o substrato (**S**) para formar o complexo intermediário (**ES**). Este complexo é resultante da interação de estruturas entre o sítio ativo da enzima e a molécula do substrato. Em seguida, o complexo formado tem dois caminhos possíveis³¹. Tende a prosseguir no sentido de formar o produto (**P**) e liberar a enzima, ou a se desfazer para liberar o substrato (**S**). Nos dois procedimentos a enzima é liberada para que possa novamente participar de novo ciclo reacional.

A Equação 1, representa a reação do modelo proposto por Michaelis-Menten, envolvendo apenas um substrato:



A velocidade de consumo do substrato [$-\text{dS}/\text{dt}$] ou de aparecimento do produto [dP/dt] diminui em função do tempo da reação.

Considerando-se que por esta teoria, o ponto central é a formação do complexo (**ES**), pode-se então relacionar a velocidade de catálise com a concentração do complexo formado e a constante K_3 . Com algumas

considerações e soluções matemáticas pode-se chegar a Equação 2,

$$V_o = V_{\max} [S] / ([S] + K_M) \quad (2)$$

que é a Equação de *MICHAELIS-MENTEN*.

Essa equação justifica então, o comportamento cinético de uma enzima.

De acordo com esta teoria, em concentração muito baixa de substrato e sendo esta muito menor que a constante de MICHAELIS-MENTEN (K_M), a velocidade (V_o) é diretamente proporcional à concentração do substrato. Quando a concentração de substrato é alta, a velocidade é máxima ($V_{\max}$) e independe daquela concentração do mesmo. Se a concentração de substrato é igual a K_M , então a velocidade é a metade da velocidade máxima. Ou seja, K_M é igual à metade da concentração do substrato na qual a velocidade da reação é a metade de seu valor máximo.

I.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

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

A velocidade inicial de uma reação enzimática é diretamente proporcional à quantidade de sítios ativos presentes, se a concentração do substrato não estiver em níveis de saturação e as outras condições otimizadas e mantidas constantes.

A curva da Figura 1, apresenta uma hipérbole e corresponde ao fato de que, além de uma certa concentração de enzima, todo substrato estará na forma de complexo, e a concentração deste, irá permanecer constante, portanto, a velocidade também irá manter-se constante.

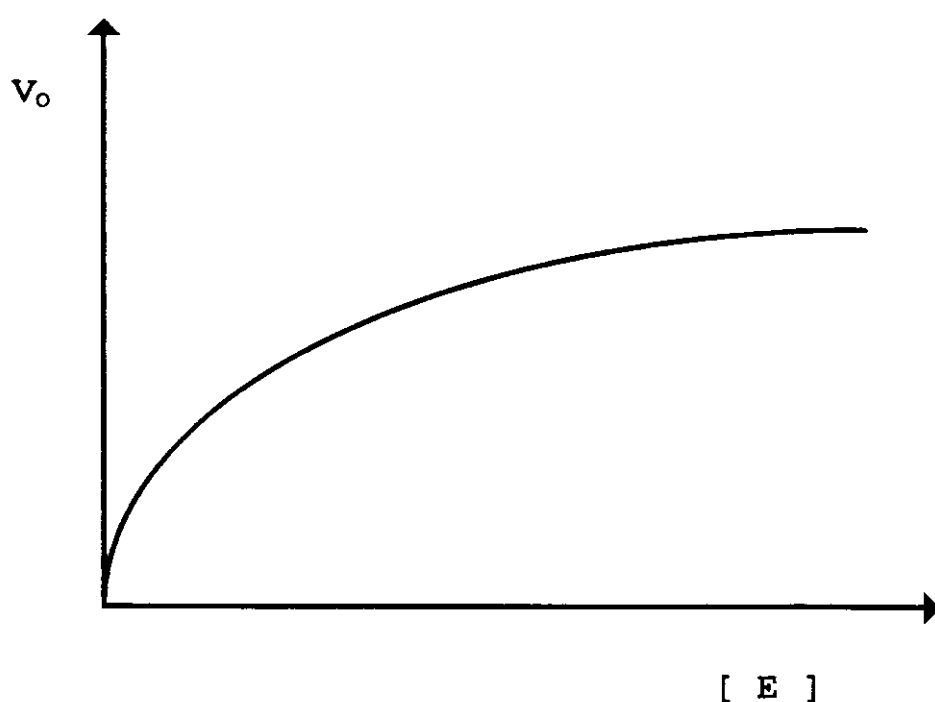


Figura 1. Gráfico da variação de velocidade inicial de uma reação enzimática em função do aumento da concentração de enzima no meio.

Colocar substrato em nível de saturação significa que a reação é limitada apenas pela concentração da enzima. Nesta condição, a atividade enzimática pode ser estimada através do acompanhamento da velocidade da reação.

Na Figura 1 a curva apresenta uma trajetória hiperbólica que corresponde ao fato de que, além de uma certa concentração de enzima, a totalidade do substrato está sob a forma de de complexo enzima-substrato. Disto resultará que a velocidade inicial é função da concentração desse complexo que permanece constante.

A unidade de atividade enzimática pode-se então ser estabelecida através da medida da velocidade da reação a partir de uma quantidade de substrato consumido, ou produto formado, numa unidade de tempo e temperatura específica.

I.4.1. UNIDADE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A unidade adotada pela IUPAC e pela International Union of Biochemistry Commissions on Enzymes é simbolizada por (U) e significa a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um micromol de substrato por minuto, em condições definidas de temperatura, pH e concentração³².

As condições experimentais como pH, concentração de substrato, temperatura devem ser definidas sempre.

Outras expressões de atividade enzimática que também podem aparecer na literatura são:

I) Atividade específica: expressa como unidade de enzima por miligrama de proteína.

II) Atividade molecular: unidade por micromol de enzima em concentração ótima de substrato (número de moléculas de substrato transformado por minuto por molécula de enzima).

III) Centro de atividade catalítica: número de moléculas de substrato transformado por minuto por centro catalítico (para grupos que tenham um grupo prostético ou centro catalítico cuja concentração possa ser medida).

IV) Katal: quantidade de enzima capaz de converter um mol de substrato por segundo.

I.5. FATORES QUE AFETAM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Dentre os principais fatores que afetam a cinética enzimática destacam-se: concentração do substrato, concentração da enzima, ativadores enzimáticos, inibidores enzimáticos, temperatura, pH, força iônica e a presença de cofator.

I.5.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

O efeito da concentração de substrato em reações enzimáticas pode ser estudado de acordo com a equação de Michaelis-Menten:

$$V_o = V_{\max} [S] / (K_M + [S])$$

A velocidade de uma reação enzimática é diretamente proporcional à concentração de substrato, sendo que seu aumento deverá atingir um valor limite.

Para baixas concentrações de substrato, $[S] \ll K_M$ a reação enzimática apresenta uma cinética de primeira ordem ou pseudo primeira ordem com relação ao substrato. A equação de Michaelis-Menten pode ser escrita como:

$$V_o = V_{\max} [S] / K_M$$

Para altas concentrações de substrato, $[S] \gg K_M$, a reação é de primeira ordem em relação ao substrato e a equação de Michaelis-Menten se reduz a:

$$V_o = V_{\max}$$

Para altas concentrações de substrato observa-se, também que a velocidade da reação sofre um decréscimo, não previsto na equação de Michaelis-Menten, que pode ser devido á formação de complexo não efetivo com duas ou mais moléculas de substrato combinando com o mesmo sítio ativo da enzima. Isto é observado com enzimas que possuem dois ou mais grupos, cada um combinando com uma parte da molécula do substrato. Em um complexo efetivo, uma molécula de substrato está combinada com todos estes grupos. Se algum destes grupos é bloqueado com outras moléculas, pode ser formado um complexo não efetivo no qual um substrato combina-se com somente um grupamento da enzima. A tendência de formação de um complexo não efetivo aumenta se a concentração do substrato aumenta.

I.5.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA

A velocidade de uma reação enzimática é função da concentração da enzima, de acordo com o modelo de Michaelis-Menten, representado na Equação 1:

$$V_o = K_3 [E] [S] / (K_M + [S])$$

De acordo com a teoria, um aumento da velocidade de reação é proporcional ao aumento na concentração da enzima. Observa-se, às vezes, um desvio da linearidade para altas concentrações de enzima, o que pode ser justificado não pelo decréscimo da atividade enzimática, mas, como uma limitação na técnica de medida.

I.5.3. EFEITO DA TEMPERATURA

O aumento de temperatura pode ter alguns efeitos sobre uma reação catalisada por enzima. Dois efeitos de maior interesse são: o aumento da velocidade da reação catalisada e o aumento da velocidade de desnaturação da enzima³². Em muitos casos o aumento de 10°C, pode causar um duplicação na velocidade de reação, sendo que um controle de temperatura de $\pm 0,1^\circ\text{C}$ é suficiente para se obter uma boa reprodutibilidade dos dados analíticos no que se refere à enzima. Um gráfico de velocidade em função da temperatura, para sistemas enzimáticos, geralmente se apresenta na forma de um "sino" , o que pode ser justificado em termos do aumento de colisões entre a enzima e o substrato á medida que aumenta a temperatura, tendo em contrapartida o aumento da velocidade de desnaturação da enzima.

I.5.4. EFEITO DO pH

Os efeitos mais importantes do pH estão relacionados com a velocidade da reação. Mudança de pH pode afetar a forma iônica do substrato ou da enzima, ou de ambos. É bom lembrar que a mudança de pH também produz espécies iônicas impróprias do substrato, podendo assim, contribuir para alterar a atividade catalítica. O pH no qual se observa o máximo de atividade enzimática é denominado de pH ótimo. Este pH é fixado em função das condições experimentais.

É fácil entender que quando um grupo -COO- do sítio ativo é necessário á fixação do substrato, uma diminuição de pH do meio acarreta sua protonação formando o -COOH , não permitindo mais a imobilização do substrato, suprimindo a atividade enzimática. Vale resaltar também que aminoácidos da cadeia proteica pode ter grau de dissociação diferente em função da mudança de pH do meio, o que acarretará também perda de atividade enzimática.

I.5.5. EFEITO DO COFATOR ENZIMÁTICO

O aceptor de elétrons para todos organismos aeróbicos é o oxigênio. A transferência eletrônica de moléculas envolvidas na obtenção de energia pelo ser vivo é feita via transportadores especiais de elétrons

que são chamados de cofatores. Cofatores podem também atuar como transportadores de grupos funcionais, átomos específicos numa reação enzimática. NADH, FADH₂, NADPH e acetil-CoA (acetil coenzima A) são os mais importantes cofatores enzimáticos. Algumas enzimas também podem requerer íon metálicos para se tornarem um catalisador ativo, como por exemplo, a álcool dehidrogenase, que requer Zn²⁺. A parte reativa do NAD⁺ é o anel nicotinamida, enquanto no FAD é o anel aloxazina.

I.5.6. EFEITO DE ATIVADORES E INIBIDORES

A atividade enzimática pode ser modificada pela presença de outros compostos que não o substrato e a enzima são chamados de ativadores ou inibidores. São compostos importantes nos fenômenos de regulação e estudo mecanísticos da ação enzimática.

I.5.6.1. ATIVADORES

Ativador é uma substância necessária para que a enzima catalize uma reação, ou ainda, para aumentar o poder catalítico da enzima. A concentração de um ativador sobre a velocidade inicial é similar ao da concentração do substrato. Alguns ativadores são íons metálicos, como Mg²⁺, Mn²⁺ ou Ca²⁺. Outros são substâncias orgânicas complexas, entre as quais freqüentemente se encontram derivados das vitaminas.

I.5.6.2. INIBIDORES

O processo de inibição enzimático é um instrumento de regulação enzimática e um dos mais importantes procedimentos de diagnóstico para os enzimologistas.

Estados de inibição geralmente indicam algo em relação à especificidade de uma enzima, sua estrutura física e química do sítio ativo e o mecanismo cinético da reação. Constantemente encontramos inibidores simulados como drogas, antibióticos, preservativos em alimentos, venenos e outros.

A ação do inibidor se faz notar ao reagir com o catalizador ou com um dos reagentes. Alguns metais podem ser determinados via reação enzimática, pois algumas enzimas são muito sensíveis a traços de determinados metais.

I.5.7. EFEITO DA FORÇA IÔNICA

A presença de sais pode afetar a velocidade de uma reação enzimática pela mudança do equilíbrio de formação do complexo ativado entre a enzima e o substrato ou então combinando-se com o substrato. Por isso, o tipo de tampão empregado bem como sua concentração pode afetar de maneira significativa a atividade enzimática.

I.6. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Os processos de imobilização enzimática podem ser incluídos nas seguintes categorias: oclusão em matriz, microencapsulação, adsorção, ligação química covalente com o suporte e ligação química covalente cruzada^{30,33}.

I.6.1. OCLUSÃO

O método de oclusão consiste no confinamento da enzima dentro de espaços intersticiais de um polímero insolúvel em água, como por exemplo, agar-agar, álcool polivinílico, amido e outros. Nesse procedimento, o monômero, catalisador da polimerização e a enzima a ser imobilizada são misturados em uma solução tampão apropriada. A estrutura do polímero formada apresenta espaços intersticiais que permitem a difusão de moléculas do substrato, que na maioria das vezes são menores do que as da enzima.

Como vantagem desse processo de imobilização de enzima pode-se destacar a não modificação da reação entre enzima e substrato, pois a enzima não sofre nenhuma modificação estrutural. É um processo pouco usado porque uma perda de enzima é verificada em função da dificuldade de obtenção de polímeros com tamanho de interstícios uniformes.

I.6.2. MICROENCAPSULAÇÃO

Na microencapsulação o confinamento da enzima é realizado em microcápsulas (pequenas esferas) que têm uma membrana, cujos poros podem variar de 5 a 300nm, permitindo assim a livre movimentação de substrato e produto da reação enzimática sem permitir a saída da enzima. Como vantagem desta metodologia pode-se citar a possibilidade de imobilizar simultaneamente várias enzimas em apenas uma etapa. Entretanto, a necessidade de alta concentração de enzima e a dificuldade de fixar essas microcápsulas num sensor tem dificultado sua aplicação.

I.6.3. ADSORÇÃO

O processo de adsorção de um enzima sobre um suporte insolúvel é um método simples e resulta das interações do tipo iônico, polar e pontes de hidrogênio entre a enzima e o suporte. Os adsorventes mais comumente usados são o vidro, carvão vegetal, sílica gel, alumina. A simplicidade dessa metodologia é citada como uma das vantagens, porém, a enzima não se encontra firmemente ligada ao suporte, sendo a estabilidade da imobilização extremamente dependente do pH, do solvente e da temperatura.

I.6.4. LIGAÇÃO COVALENTE COM O SUPORTE

A imobilização de enzima em suporte insolúvel é feita através da ligação covalente de grupos funcionais não ativos da enzima e grupos reativos (hidroxila, carbonila, amino e fenólico) ligados na superfície do suporte. Como suportes usados para esta finalidade pode-se citar o agar-agar, celulose, colágeno , amido e como suportes inorgânicos pérolas de vidro com porosidade controlada. Como vantagem desse processo de imobilização pode-se citar uma menor susceptibilidade aos efeitos de pH, força iônica, solvente e temperatura.

I.6.5. LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA

Esta técnica de imobilização enzimática é muito usada, isto se deve em parte, devido a facilidade de uso e o número de enzimas que podem ser imobilizadas com esta técnica. O procedimento consiste na utilização de reagentes bifuncionais que reagem com a enzima ou proteína formando-se um composto pouco solúvel em água. Da reação entre a enzima e o reativo, formam-se ligações cruzadas intermoleculares, com a obtenção de macromoléculas pouco solúveis em água. Os grupos funcionais usados pelo reagente podem pertencer ou não à mesma classe de compostos químicos. Dentre os reativos bifuncionais usados pode-se citar o glutaraldeído, ácido

bisdiazobenzidina 2,2'-dissulfônico, 1,5-difluor 2,4 dinitrobenzeno e 2,2-isocianato 4-isotiocianato tolueno.

O glutaraldeído é o mais empregado no processo de imobilização via ligação covalente cruzada, por apresentar resultado mais satisfatório e reprodutível.

Um esquema mostrando o possível mecanismo que inicialmente foi proposto, para a imobilização de enzima empregando glutaraldeído é apresentado na Figura 2.

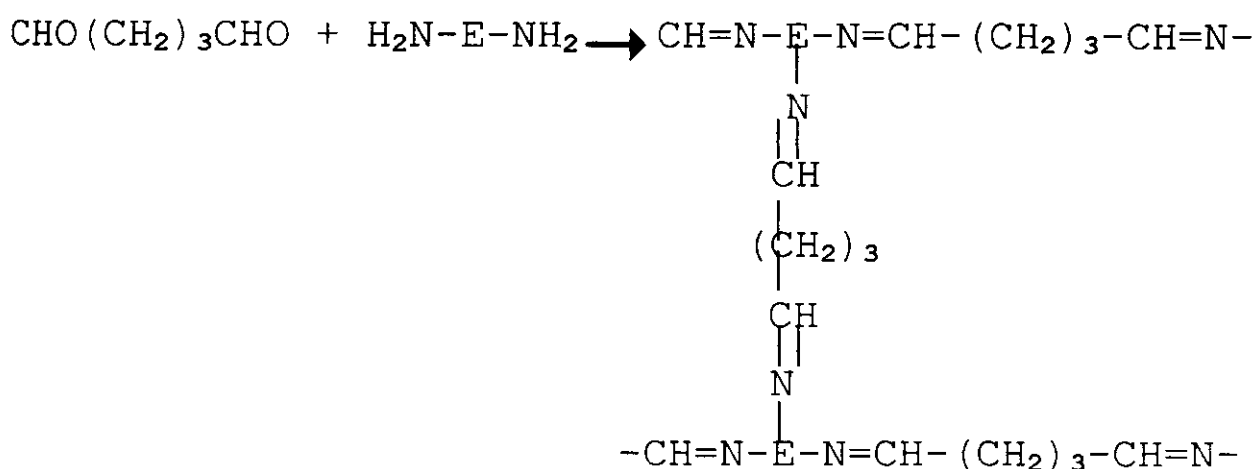


Figura 2. Esquema geral de imobilização enzimática, usando-se o glutaraldeído como reagente bifuncional³³.

A ligação formada entre a enzima e o glutaraldeído é irreversível e suporta variações de pH e temperatura. A participação de grupos aldeídicos do reagente e grupos aminos da enzima formando uma base de Schiff é um dos mecanismos citados na literatura.

Outro mecanismo, envolve a reação da adição conjugada dos grupos amino da enzima às duplas ligações etilênicas dos α e β oligômeros insaturados contidos nos reagentes comerciais. Esta alternativa pode ser visualizada pelo esquema da Figura 3.

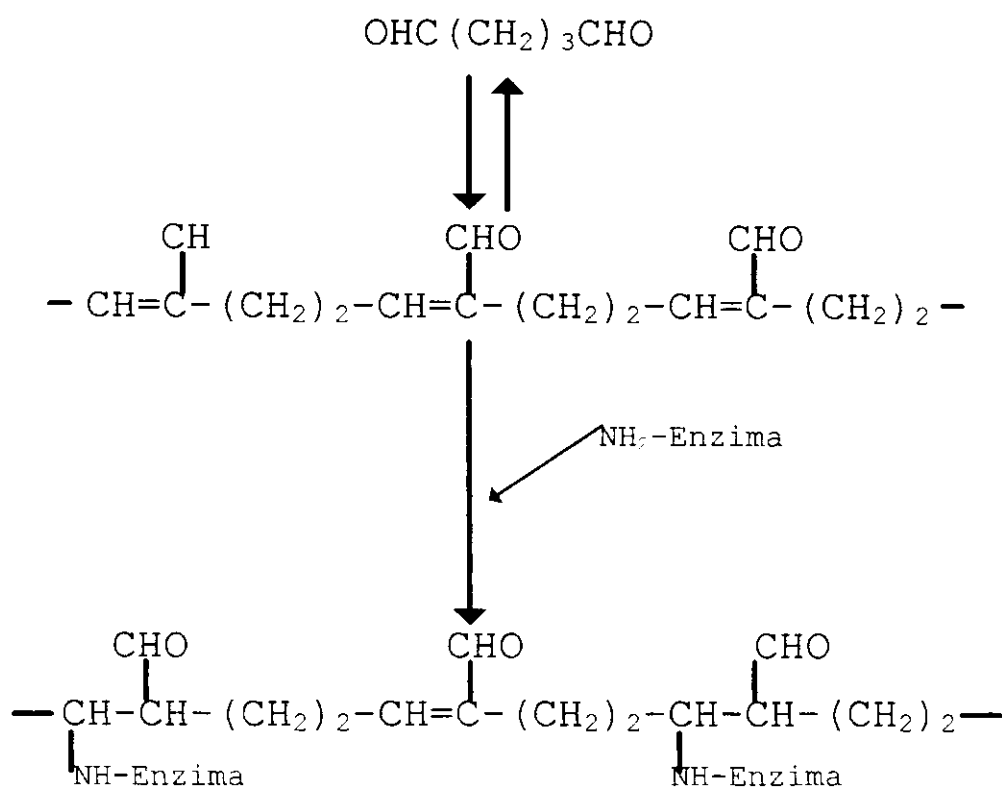


Figura 3. Esquema da imobilização enzimática com glutaraldeído envolvendo grupos amino da enzima e dupla etilênica do reagente³³.

Este mecanismo explica melhor a estabilidade da ligação, que não pode ser devida à simples formação da base de Schiff. Explica também a obtenção de um produto

com maior atividade enzimática se a reação ocorrer entre a enzima e um glutaraldeído comercial em relação a um glutaraldeído recém destilado.

Como vantagens da técnica pode-se mencionar a simplicidade, possibilidade do controle das propriedades físicas da enzima devido à ligação química entre enzima e reativo.

Como desvantagem cita-se a possibilidade da inativação de algumas enzimas em contato com o reagente.

CAPÍTULO II

BIOSSENSORES

II.1. INTRODUÇÃO

Diversas áreas da ciência têm se beneficiado com a descoberta e desenvolvimento das técnicas de imobilização de diferentes espécies. A construção de biossensores, muito pesquisada atualmente, tem obtido destaque pela sua aplicação, especificidade, tempo de resposta pequeno, baixo custo, portabilidade, facilidade de uso construção e obtenção de resposta em tempo real²⁸. O desenvolvimento de tecnologias para obtenção de microeletrodos aparece como de fundamental importância para medidas de espécies neuroquímicas em organismos vivos. O interesse de construir sensores/biossensores que podem ser implantados em microambientes(ex. dentro de uma célula), cuja matriz é extremamente pequena e complexa foi assunto revisado recentemente³⁴.

Hoje, grande número de pesquisas sobre biossensores têm sido direcionadas para sua aplicação na química, medicina, meio ambiente, indústrias alimentícias e biotecnologia²⁷.

O monitoramento local das reações que ocorrem nos diversos ecossistemas, idéia de monitoração contínua **in vivo**, avanços alcançados na biotecnologia e a possibilidade de uso de sistemas miniaturizados portáteis são requisitos que colocam o biossensor em evidência.

Além dos biossensores que já se encontram no mercado, estudos e propostas para construção e aplicação de novos biossensores ocupam grande espaço no meio científico, tornando-se temas de grande importância nas diferentes áreas da ciência.

A especificidade do componente biológico possibilita o uso de biossensor em matrizes complexas como: sangue³⁵, soro³⁶, urina³⁷ e outras¹⁰⁵.

Em quase todas as aplicações, o pré-tratamento de amostra requerido é mínimo, diminuindo o custo por análise.

II.2. CONCEITO DE BIOSSENSOR

Biossensor é um dispositivo que apresenta um elemento **biológico ativo** intimamente conectado, ou integrado, a um **transdutor**.

Transdutor é qualquer dispositivo que converte uma energia de entrada em uma energia de saída, geralmente, de forma diferente, mas mantendo-se uma relação conhecida entre elas.

A Tabela 1, mostra algumas combinações possíveis entre o tipo de transdutor e o elemento biológico, embora algumas não tenham sido ainda exploradas como biossensor³⁸.

Em qualquer tipo de combinação entre o transdutor e o elemento biológico, o objetivo principal a ser

alcançado é a produção de um sinal eletrônico que possa ser relacionado com a quantidade de analito do sistema.

Com base no tipo de transdutor utilizado, pode-se classificar os biossensores em amperométricos, ópticos, calorimétricos, acústicos e outros.

II.2.1. BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO

O primeiro biossensor amperométrico surgiu na década de 60. Hoje, existe uma diversidade de enzimas que podem ser usadas na construção de biossensores³⁹.

Enzimas oxiredutases, ou redox, têm proporcionado interesse para a construção de biossensores amperométricos, devido à transferência de elétrons envolvida na conversão enzimática do substrato.

Tabela 1. Componentes biológicos e transdutores que podem ser empregados na construção de biossensores³⁸.

Componente Biológico	Transdutor
Organismos	Potenciométrico
Tecidos	Amperométrico
Células	Conducométrico
Organelas	Impedimétrico
Membranas	Óptico
Enzimas	Calorimétrico
Componentes Enzimáticos	Acústico
Receptores	Mecânico
Anticorpos	Molecular Eletrônico
Moléculas Orgânicas	-----
Ácidos nucleicos	-----

Investigações têm sido orientadas com o objetivo de se obter uma transferência rápida e eficiente entre o cofator enzimático e a superfície do eletrodo, a baixos potenciais.

Pequenas moléculas inorgânicas ou orgânicas, que atuam como mediadores de elétrons, têm sido utilizadas para fazer o transporte de carga do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo.

Este campo tem proporcionado grande número de pesquisas, voltadas para o desenvolvimento das técnicas de imobilização de mediadores e enzimas sobre a superfície do eletrodo ou no eletrodo (pasta de carbono)^{21,40,41}.

II.3. CONSTRUÇÃO DE UM BIOSENSOR

O acoplamento do material biológico, a um transdutor suporte, pode ser realizado por diferentes técnicas: Fixação do material biológico com membrana porosa, adsorção, ligação covalente, ligação covalente cruzada, inclusão, polimerização química e/ou eletroquímica.

II.3.1. USO DE MEMBRANA NA FIXAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Esta técnica é muito simples, pois fixa fragmentos de tecidos de plantas ou animais na superfície do transdutor. O componente biológico ativo na maioria das vezes se encontra naturalmente imobilizado.

II.3.2. ADSORÇÃO

Aqui, se entende por adsorção quando há adesão do componente biológico à superfície de um suporte que não tenha sido tratado especificamente para formar ligação covalente. Neste tipo de imobilização, estão envolvidas,

ligações fracas tipo forças de Van Der Wals e pontes de hidrogênio, podendo ocorrer também forças eletrostáticas em alguns casos. Sua desvantagem reside no fato do material biológico ativo ser facilmente perdido, devido aos efeitos de pH, solvente, substrato, temperatura e força iônica.

II.3.3. LIGAÇÃO COVALENTE COM UMA MATRIZ INSOLÚVEL

Esta é uma técnica muito empregada. Por este método a enzima é mantida num ambiente muito parecido com aquele onde ela se encontra na natureza, portanto tem maior estabilidade frente aos efeitos de pH, força iônica, solvente e temperatura. As exceções são em números reduzidos. Emprega-se uma variedade de suportes, que geralmente são ativados por reações de derivatização⁴⁰.

A imobilização é feita por meio de ligações entre grupos funcionais do suporte e grupos funcionais da dos aminoácidos da enzima não são essenciais para sua atividade catalítica.

II.3.4. ELETROPOLIMERIZAÇÃO

A eletropolimerização surge como uma das tecnologias promissoras para fabricação, em larga escala de biossensores comerciais^{41,42}.

Em 1977, demonstrou-se que filmes de poliacetileno exibiam propriedades semicondutoras e metálicas, por meio de oxidação parcial (p-dopado) e que a condutividade podia ser semelhante a de um metal, por redução parcial (n-dopado)⁴³. Descobriu-se em seguida, que essas dopagens podiam ser acompanhadas eletroquimicamente e que esses processos eram eletroquimicamente reversíveis.

Grande impulso na técnica veio com o aparecimento, de polímeros condutores como polipirrol, politiofeno, polianilina e outros, depois de 1979.

Pirrol, certamente, é o monômero mais usado para se obter membranas eletropolimerizadas, muito importantes do ponto de vista analítico. A Figura 5, mostra a estrutura de alguns monômeros estudados, que podem ser eletropolimerizados^{42,44}.

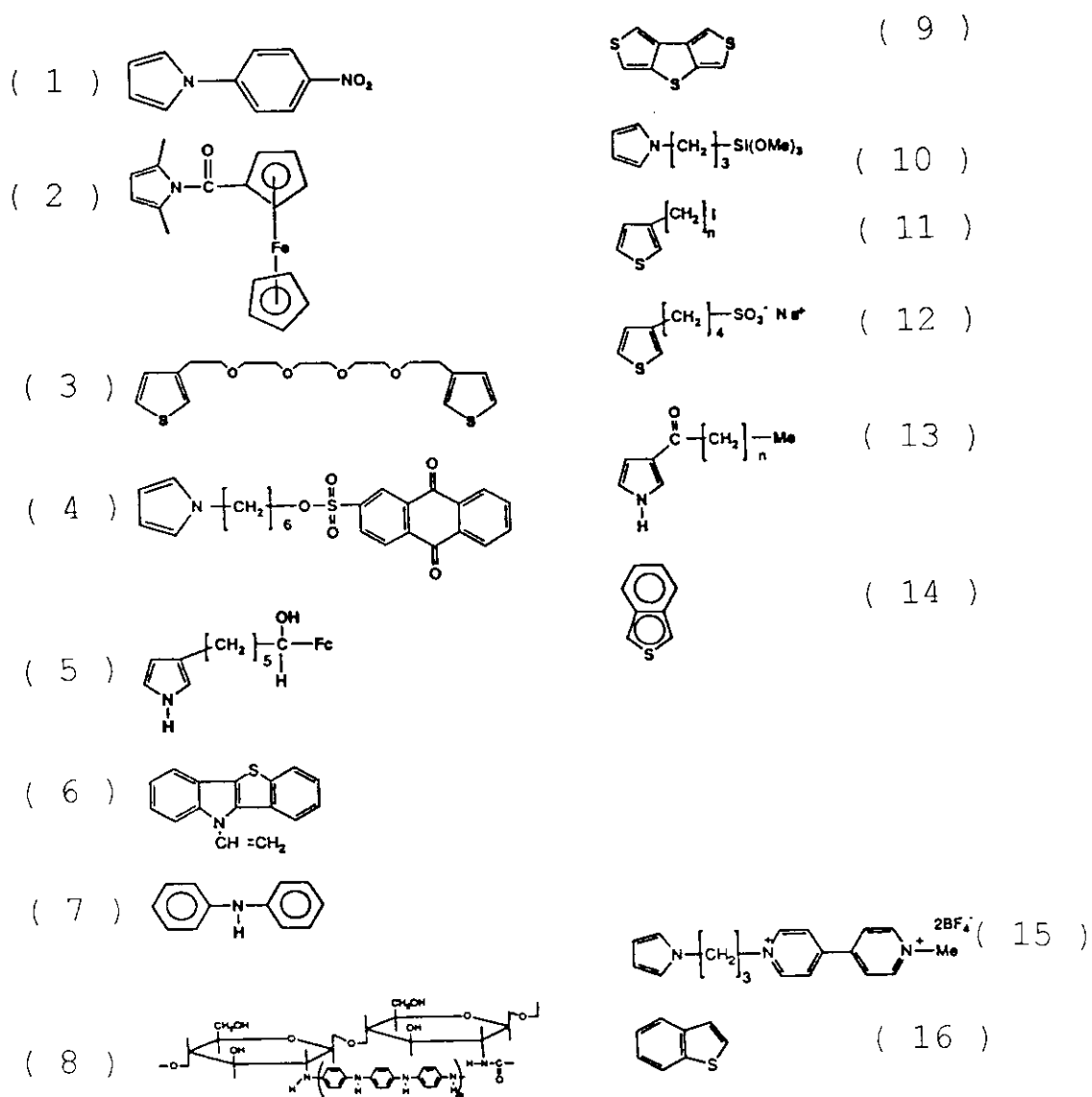


Figura 5. Estruturas dos monômeros (denominações no apêndice 1) mais estudados cujos filmes são obtidos por eletropolimerização⁴⁴.

Como materiais de eletrodos de trabalho para eletropolimerização, têm sido usados: carbono vítreo, platina, ouro⁴⁵. Menos comum é a utilização de outros materiais como vidro condutor(vidro recoberto com óxido de estanho e índio (ito), titânio, alumínio, aço e filmes plásticos recobertos com ouro, prata ou óxido de estanho. Carbono vítreo é o que tem apresentado melhores resultados analíticos, pois além de possuir a mais ampla faixa de potencial de trabalho, permite obtenção de filmes firmemente aderentes.

A remoção destes filmes, geralmente é feita por tratamento químico com solução sulfonítrica ou por tratamento físico com polimento da superfície utilizando-se aluminas de granulometria decrescente. O uso de ultra-son para remoção de partículas da alumina, pode ser empregado.

II.4. DOPAGEM DO FILME DE POLIPIRROL

Durante a obtenção do filme, por razões de eletroneutralidade, contraíons, chamados de **dopantes**, são inseridos na matriz do polímero condutor, que pode ser considerado como um sal orgânico polimérico.

A versatilidade de dopagem do polipirrol por ânions^{46,48}, torna o pirrol a matéria prima de maior aceitação para construção de biossensores.

A incorporação do contra-íon, durante a polimerização, influi decididamente nas propriedades

físicas como: adesão, condutibilidade, morfologia, resistência mecânica e atividade química.

A importância do pirrol, em relação aos outros compostos, reside ainda, no fato de que para obtenção do filme de polipirrol, vários solventes podem ser usados, incluindo-se a água. Este comportamento possibilita a obtenção de uma mistura homogênea do pirrol com proteínas e/ou mediadores eletrônicos inorgânicos ou orgânicos. A imobilização de enzimas em polímeros condutores eletropolimerizados sobre superfícies de eletrodos tem sido uma das metodologias mais usadas.

Algumas alternativas são possíveis para se colocar enzima e/ou mediador imobilizados na superfície de um eletrodo ou no eletrodo. A obtenção do polímero a partir de uma solução contendo a enzima e o monômero, pode proporcionar a inclusão da enzima no filme polimérico⁵⁰.

A imobilização da enzima associada à do mediador, com polímeros eletropolimerizados, usando-se uma solução contendo as duas espécies solubilizadas juntamente com o monômero, pode ser empregado^{42,49}.

Pode-se pensar ainda na utilização de dois filmes, sendo que em um deles estará o mediador e no outro a enzima imobilizada ou vice versa. A utilização de um procedimento misto, onde o mediador é imobilizado em filme de polipirrol eletropolimerizado, e a enzima imobilizada com glutaraldeído na construção de um biossensor para salicilato, constitui uma das propostas deste trabalho.

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

III.1. REAGENTES

Pirrol da marca Aldrich, foi sempre destilado à baixa pressão antes do uso.

Todas soluções usadas nesse trabalho foram preparadas com água desmineralizada.

Enzima salicilato hidroxilase (E.C. 1.14.13.1.) 5,5U por mg de proteína e β -NADH foram adquiridos da Sigma Co.

Salicilato de sódio p.a e glutaraldeído 50%(m/v) em água (Fluka) foram usados , respectivamente, no preparo das soluções padrões e como reagente de ligação covalente cruzada.

Ferrocianeto de potássio (Riedel) p.a foi usado, sem qualquer purificação anterior ao seu uso.

A enzima β -D glicose oxidase (EC 1.1.3.4) e β -D glicose foram adquiridas da Sigma Co.

Para ajustes de pH, foi sempre usado tampão de ácido Piperazina-N-N'-bis-2 Etanosulfônico (PIPES) marca Sigma, com a fórmula molecular $C_8H_{18}N_2O_6S_2$ pKa = 6,8 e faixa de pH útil entre 6,1 e 7,5.

Tampão fosfato foi preparado na concentração de 0,1 mol L⁻¹, pH = 7,4.

Alumina de granulometria 0,3 e 0,5 μ m foram usadas na limpeza do eletrodo de carbono vítreo e platina.

Amostras de comprimidos para análise de salicilato foram obtidos no comércio farmacêutico.

Amostras de soro sanüíneo foram fornecidas pelo Hospital das Clínicas da UNICAMP, tendo-se o cuidado de serem analisadas no mesmo dia da coleta.

III.2. EQUIPAMENTOS

Eletrodo de carbono vítreo (Metrohm), fio de platina, eletrodo de calomelano saturado (PAR), foram usados, respectivamente como eletrodo de trabalho, auxiliar e de referência.

Potenciostato modelo 273A da PAR, acoplado a um microcomputador foi utilizado em todas as medidas eletroquímicas.

Ajustes de pH foram realizados com auxílio de um eletrodo de vidro combinado, acoplado a um peagâmetro (Micronal), modelo B273.

Aparelho de ultrassom marca Thrornton T14 foi usado para auxiliar na remoção de partículas das superfícies dos eletrodos.

Um sistema para destilação de pirrol foi contruido para permitir destilação á baixa pressão.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas num espectrofotômetro marca Pharmacia, modêlo U2000 interfaciado a um microcomputador PC.

III.3. CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR PARA SALICILATO

Na construção do biossensor foram empregadas duas etapas distintas.

A primeira, consistiu na obtenção do filme de polipirrol dopado com o mediador hexacianoferrato, via eletropolimerização.

Na segunda, uma solução de glutaraldeído contendo a enzima, na quantidade adequada, foi colocada sobre o filme de polipirrol, cujo conjunto foi denominado **BIOSSENSOR**. Esta denominação será aplicada ao longo deste trabalho.

III.4. SISTEMÁTICA PARA OBTENÇÃO DO FILME DE POLIPIRROL

O mesmo procedimento foi usado para todos filmes de polipirrol, obtidos durante a realização deste trabalho.

III.4.1. LIMPEZA DO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO

A limpeza da superfície do eletrodo de carbono vítreo, foi feita com polimento manual, atritando-a sobre uma flanela, com movimentos circulares. A flanela foi suportada por uma placa de vidro e embebida com alumina 1,0 μ e 0,3 μ , separadamente. O procedimento de limpeza adotado previne a formação de planos na superfície do eletrodo, o que danifica o eletrodo. Cuidado adicional durante o processo de polimento foi a

manutenção do eletrodo na posição vertical. Finalizando o polimento com a alumina de menor granulometria, o eletrodo foi sonificado num tubo de ensaio, contendo água desmineralizada, por cinco minutos para evitar partículas em sua superfície. A seguir foi lavado com água desmineralizada. A verificação da limpeza da superfície foi avaliada por ensaios voltamétricos. Os mesmos eram conduzidos em tampão fosfato pH = 7,4 como eletrólito suporte, fazendo-se varredura de potencial numa faixa entre -0,2 a 0,8 V vs ECS, com uma velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹.

III.4.2. MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO

Após a limpeza da superfície, o eletrodo foi colocado numa solução recém preparada de ferrocianeto de potássio 0,1 mol L⁻¹, contendo pirrol, recém destilado, na concentração de 0,1 mol L⁻¹. A solução foi desoxigenada durante dez minutos, após o que o sistema permaneceu em ambiente de nitrogênio.

O filme foi obtido aplicando-se um potencial de 0,7 V vs ECS e monitorando-se a carga em função do tempo. Potenciais maiores podem levar a perda das propriedades eletroquímicas do polipirrol⁷⁹. Por outro lado, nas condições experimentais usadas em nosso trabalho, não se observou formação de filme na superfície do eletrodo de carbono vítreo quando

potenciais menores que 0,7 V foram aplicados na célula eletroquímica.

Após, lavagem do filme, com água desmineralizada, para retirar o dopante não adsorvido, o eletrodo modificado foi colocado em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH = 7,4. A verificação da dopagem ou não do filme foi feita por voltametria cíclica, numa faixa de potencial entre -0,1 e +0,4 V, com uma velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

III.4.3. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA SALICILATO HIDROXILASE

A imobilização da enzima foi realizada após comprovada a incorporação do Fe(CN)₆^{3-/4-}, no filme de polipirrol. Para isto, foi preparada uma solução contendo 10 µL de uma solução de soro albumina 10% m/v e 50 µL de uma solução contendo 44U de enzima por mililitro mais 25 µL de uma solução contendo glutaraldeído 5% v/v. A solução foi cuidadosamente misturada e desta solução resultante foram colocados 50 µL sobre o filme de polipirrol. O conjunto foi deixado em repouso para evaporação do solvente e completar a reação entre a enzima e o glutaraldeído. Todas as soluções foram preparadas usando tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH = 7,4 como solvente.

III.5. PREPARO DAS AMOSTRAS DE COMPRIMIDO.

Cerca de seis comprimidos de cada marca, foram triturados. Tomadas de ensaio, equivalentes a cerca de 215,0 mg de acetilsalicílico, fora refluxada com 10,0 ml de solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹, por uma hora. As misturas resultantes foram filtradas, neutralizadas com solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ e transferidas quantitativamente para outro balão de 50,0 ml e o volume completado com água desmineralizada.

Outras diluições necessárias, foram sempre realizadas usando-se solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH = 7,4 como diluente.

O mesmo procedimento de preparo de amostras foi utilizado para as análises, de cada tipo de comprimido, em triplicata.

III.6. CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR PARA GLICOSE

Os materiais **ST**, **STFc** e a **STFcEz**, são misturados separadamente, com grafite em pó numa proporção de 3 para 4 partes em massa e adição de gotas de óleo mineral até obter um produto pastoso.

Na cavidade do eletrodo colocou-se então cerca de 5 mg da pasta previamente preparada.

O eletrodo foi construído usando-se um tubo de vidro, tendo em uma de suas extremidades uma lâmina de platina soldada no vidro por quecimento, na forma disco e com área de aproximadamente $0,2 \text{ cm}^2$, de tal forma a obter uma cavidade de superfície plana e horizontal.

O contato elétrico entre o disco e o terminal do eletrodo é feito usando-se um fio de níquel/crômio ou de cobre, conforme esquema apresentado na Figura 7. Este formato ajuda numa melhor reprodução da quantidade de pasta de carbono.

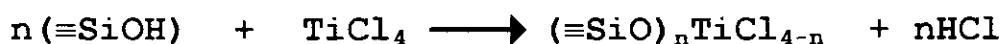
III.6.1. PREPARAÇÃO DA SÍLICA / TITÂNIO

A modificação da superfície da sílica gel com óxido de titânio (IV), foi realizada através da reação entre os grupos silanóis da superfície da sílica com tetracloreto de titânio, em meio orgânico e sobre atmosfera inerte⁸⁰.

Em aproximadamente 80 gramas de sílica gel, previamente seca a 150°C em linha de vácuo durante 4 horas, foram adicionados 400 mL de tetracloreto de carbono, e em seguida 20 mL de tetracloreto de titânio. Esta mistura foi então refluxada por 10 horas sob atmosfera de nitrogênio e constante agitação mecânica. O sólido resultante foi filtrado e lavado com tetracloreto de carbono num filtro de Schlenk sob atmosfera de nitrogênio e em seguida o mesmo foi aquecido a 130°C por 4 horas sob vácuo. Com este procedimento obteve-se assim os titânios ainda clorados na superfície.

Numa segunda etapa, o material foi colocado em atmosfera de vapor de água, para proporcionar uma hidrólise lenta, e posteriormente lavado com água desmineralizada até remover todos os íons cloretos. Finalmente o produto foi seco a 150°C por 4 horas sob vácuo. O produto aqui obtido foi denominado de uma superfície **ST**.

As reações que ocorrem durante o procedimento podem ser descritas pelas seguintes equações:



Onde **(=SiOH)** representa grupo o silanol e para simplificação durante a escrita do texto a sílica

modificada, $(=\text{SiO})_n\text{Ti}(\text{OH})_{4-n}$, será descrita como sílica/titânio cuja simbologia adotada será **ST**.

III.6.2. IMOBILIZAÇÃO DO MEDIADOR E DA GLICOSE OXIDASE

O material denominado de **ST**, foi imerso numa solução de ácido ferroceno monocarboxílico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, durante trinta minutos, com agitação constante.

O material obtido, foi filtrado e lavado com água desmineralizada e então seco à 70°C , durante uma hora. O material assim obtido será denominado por sílica/titânio/ferroceno cuja simbologia foi **STFc**.

Semelhante procedimento foi empregado para obter a enzima imobilizada naquele material.

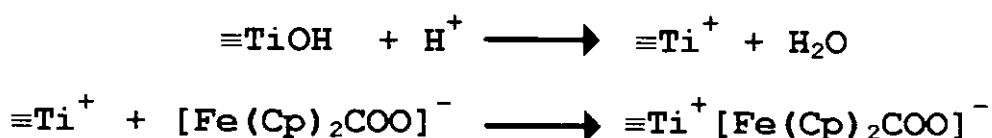
Colocou-se 2,0 g de **ST** imersa em 50 ml de solução de ácido ferroceno monocarboxílico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 200 U da enzima glicose oxidase. A mistura foi agitada durante vinte minutos, e o material lavado com água desmineralizada. Para evitar de possível perda de atividade enzimática o sólido resultante de cor amarela foi seco à temperatura ambiente ($25^\circ \pm 1^\circ\text{C}$).

A denominação do material durante o trabalho será sílica/titânio/ferroceno/enzima e será simbolizado por **STFcEz**.

III.6.3. CARACTERIZAÇÃO DA SÍLICA MODIFICADA

A área específica da **ST** é de $464\text{m}^2\text{ g}^{-1}$, determinada pelo método de Brunauer, Emmett, Teller (BET), de multipontos. O equivalente a $1,0\text{ mmol g}^{-1}$ de óxido de titânio(IV) foi enxertado sobre a superfície da sílica gel.

A adsorção do ácido ferroceno monocarboxílico, sobre a **ST** pode ser representada pelas seguintes equações:



Onde, $\equiv\text{TiOH}$ representa os grupos hidroxilas da superfície da **ST**, e $\equiv\text{Ti}^+[\text{Fe}(\text{Cp})_2\text{COO}]^-$, simbolizada por **STFc**, representa que se trata de uma **ST** que tem o mediador adsorvido em sua superfície.

A perda de mediador descrita na literatura, provocando uma diminuição no tempo de vida do biossensor, poderá ser contornada com este material, uma vez que o ácido ferroceno monocarboxílico fica fortemente aderido à superfície da sílica modificada.

A retirada do mediador não foi possível mesmo quando soluções ácidas na concentração de $1,0\text{ mol L}^{-1}$ foram usadas. O mediador só foi removido, quando uma solução de NaOH $0,5\text{ mol L}^{-1}$ foi empregada.

A imobilização da enzima provavelmente deve ocorrer de uma maneira semelhante à do mediador. Grupos carboxílicos disponíveis da enzima devem ser usados para efetuar as ligações.

A competição entre a enzima e o mediador pela sílica/titânio foi evidenciada, ao analisar a quantidade de mediador imobilizado no material. Uma diminuição de 0,15 para 0,04 mmol de mediador por grama de sílica foi encontrada, indicando que a enzima e o mediador competem pelo mesmo sítio da sílica. A quantidade de enzima imobilizada foi de 70 U por grama de material.

III.6.4. ANÁLISE QUÍMICA DO BIOSSENSOR DE GLICOSE

A análise de titânio foi feita digerindo-se cerca de 0,5g da sílica gel enxertada com ácido clorídrico concentrado, e em seguida coletando o sobrenadante por filtração. Do sobrenadante foi precipitado o titânio com solução de hidróxido de amônio e calcinado a 800°C para análise gravimétrica. Na análise do ferroceno foi usada a espectrofotometria. E para determinar a quantidade de enzima imobilizada foi feito um processo indireto, medindo-se a atividade enzimática encontrada no sobrenadante após adsorção da enzima na sílica.

CÉLULA ELETROQUÍMICA

Todas as análises eletroquímicas foram realizadas numa célula com três eletrodos. Desenvolveu-se um conjunto que permitiu utilizar pequeno volume (5,0 ml), e trabalhar em ambiente livre de oxigênio. Sua forma final é apresentada pelo esquema da Figura 6.

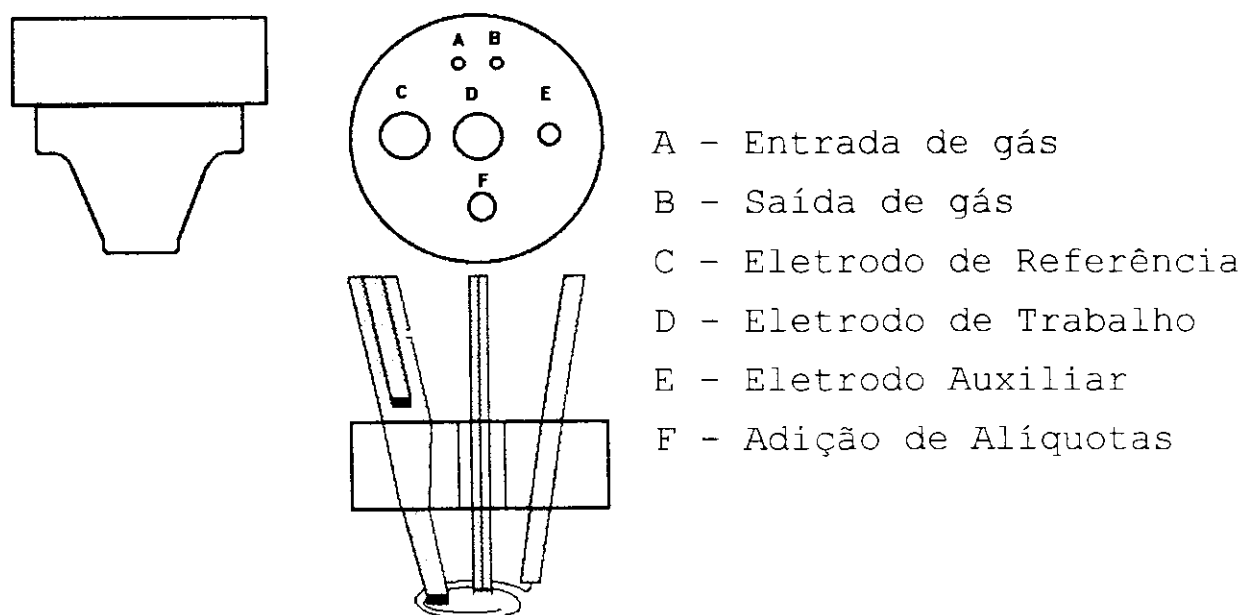


Figura 6. Esquema da célula eletroquímica usada para todas medidas eletroquímicas.

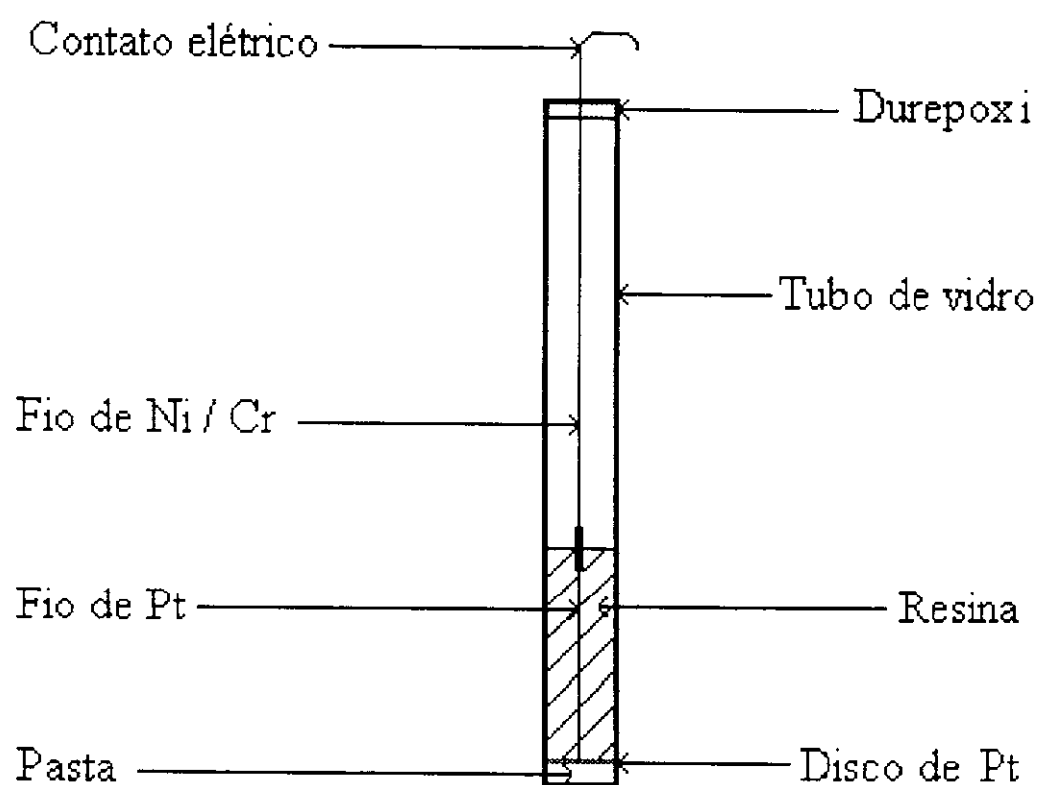


Figura 7. Esquema do eletrodo de pasta de carbono.

CAPÍTULO IV

BIOSSENSOR PARA SALICILATO

IV.1. IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE SALICILATO

Salicilato é o principal metabólito resultante da hidrólise do ácido acetilsalicílico (aspirina), cuja concentração máxima, no sangue, é atingida duas horas após ingestão do medicamento. A aspirina é provavelmente o medicamento mais usado como anti-térmico, analgésico e anti-inflamatório. Sua maior parte é rapidamente hidrolizada para ácido salicílico, que passa para a corrente sanguínea na forma de **salicilato**. Pacientes com tratamento prolongado deste medicamento e acidentes com ingestão elevada da droga são comuns. Seja em casos de enfermidades crônicas, como inflamações crônicas, que requerem altas doses do medicamento ou em casos de ingestão acidental, o monitoramento do nível de salicilato no sangue é importante, uma vez que o nível terapêutico do analito é muito próximo ao de ~~toxicidade~~^{TOXICIDADE}. A faixa de concentração terapêutica de salicilato, no plasma ou soro sanguíneo, está entre 1.1 a 2.2 milimol L⁻¹ (150 a 300 µg mL⁻¹). Concentrações maiores são consideradas tóxicas⁷². Assim, a análise segura e rápida de salicilato no soro sanguíneo é de vital importância na medicina.

Por outro lado, é de extrema importância o controle de qualidade deste medicamento na sua produção.

IV.2. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE SALICILATO

A seguir será apresentado metodologias descritas, agrupando-as de acordo com o princípio de determinação.

IV.2.1 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Em laboratório de análise clínica, as técnicas colorimétricas têm sido as mais empregadas⁵¹.

O teste de Trinder⁵², é o mais usado entre todas as metodologias colorimétricas. Seu princípio consiste na complexação de íons Fe^{3+} com ácido salicílico para formar um complexo de cor púrpura. Apesar de ser uma metodologia simples e de baixo custo, sofre interferência de compostos alifáticos enólicos, fenólicos e outras drogas como as fenotiazinas⁵³.

*Sigma diagnostic*⁵⁴, é um kit comercializado pela Sigma Co, para determinação espectrofotométrica de salicilato, cuja vantagem em relação a outros métodos, é não usar mercúrio para precipitação protéica antes da medida. Se baseia também na formação de um complexo de cor púrpura, entre íons Fe^{+3} e salicilato.

Estimativa semi-quantitativa de salicilato foi um procedimento proposto⁵⁵, obtendo-se resultados satisfatórios em análises de dez amostras de sangue de crianças que ingeriram acidentalmente o medicamento. O monitoramento do consumo de NAD(P)H durante a reação

enzimática⁵⁶ por espectrofotometria é usada para relacionar com a concentração de salicilato⁵⁶.

Problemas relacionados com interferências nestas metodologias, são resolvidos com procedimentos de pré-tratamentos de amostra, como por exemplo, a extração por solventes, tornando-se os métodos inviáveis nos casos de análise para diagnósticos rápidos.

IV.2.2. MÉTODOS POTENCIOMÉTRICOS

O desenvolvimento dos eletrodos íons seletivos, tem proporcionado o surgimento de um grande número de publicações. O primeiro trabalho com eletrodo íon seletivo para salicilato foi publicado no início da década de 70. É um eletrodo íon seletivo tipo membrana líquida construído com o trocador iônico tetraheptilamônio com salicilato em 1-decanol. Responde a salicilato numa faixa de concentração de $1,0 \cdot 10^{-1}$ a $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com um coeficiente de Nernst de 58 mV por década de concentração⁵⁷.

Em 1972, foi descrito outro eletrodo⁵⁸, sensível a salicilato, baseado no trocador iônico aliquat 336S incorporado em decanol. Este eletrodo responde para salicilato numa faixa de concentração de $1,0 \cdot 10^{-3}$ a $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com coeficiente angular de 53 mV por década de concentração.

Na década de oitenta, foram descritos outros eletrodos íons seletivos para salicilato.

A construção e aplicação de um eletrodo íon seletivo com membrana de PVC, e trocador aliquat 336S em dibutilftalato incorporado em membrana de PVC foi apresentado⁵⁹. Semelhante procedimento foi usado para construção de um eletrodo íon seletivo tipo membrana líquida baseada em haletos de tetralquilamônio e p-nitrocumeno⁶⁰ e outro eletrodo tipo membrana de PVC baseada num trocador de cristal de violeta-salicilato⁶¹, foram posteriormente apresentados.

Eletrodo íon seletivo para salicilato baseado no complexo aliquat-salicilato incorporado numa membrana de PVC, foi construído usando-se como suporte, vidro condutor⁶².

Eletrodo tubular potenciométrico, acoplado a um sistema de análise por injeção em fluxo⁶³, tem o mesmo princípio do eletrodo íon seletivo baseado no trocador iônico aliquat, incorporado numa membrana de PVC. Um fator limitante para a utilização de eletrodos íons seletivos para determinação de salicilato em matrizes complexas é o grande número de interferentes. A eliminação destes problemas requer procedimentos de pré-tratamento de amostras, o que dificulta a utilização destes sensores em análises de rotina.

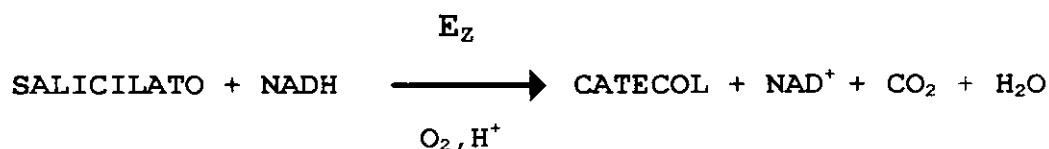
IV.2.3. OUTROS MÉTODOS NÃO ENZIMÁTICOS

A determinação de salicilato também pode ser realizada, por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)⁶⁴. O método é sensível, sendo possível detectar 50 µg L⁻¹ porém, o sistema de detecção é complexo. Acrescenta-se como desvantagem para se usar esta metodologia, a necessidade de procedimentos de extrações e de pré-concentração. Cromatografia Gasosa também tem sido descrita na literatura como procedimento analítico para determinação de salicilato⁶⁵. A fluorimetria^{66,67,68}, tem sido usada para determinação do metabólito da aspirina. Um sistema FIA cujo reator contém carbonato de cobre incorporado em resina de poliéster, tendo sua detecção por absorção atômica, também foi descrito⁶⁹.

IV.3. MÉTODOS ENZIMÁTICOS

Os métodos enzimáticos podem ser divididos em dois grupos: os que utilizam a enzima salicilato hidroxilase na forma solúvel e os que utilizam a enzima imobilizada de alguma forma.

Pela reação, representada pela equação a seguir:



E_z: significa a enzima salicilato hidroxilase

pode-se verificar, que os métodos analíticos para salicilato baseados nesta reação são relacionados com o consumo de reagentes ou com o aumento da concentração dos produtos.

IV.3.1. ENZIMA NA FORMA SOLÚVEL

O consumo de oxigênio foi usado para determinação de salicilato polarograficamente⁷⁰.

Espectrofotometria foi usada para determinar salicilato, por meio da reação entre catecol e 4-aminofenol, sendo a solução tamponada em pH = 7,6. Neste trabalho é apresentado um grande número de medicamentos que não interferem no procedimento usado⁷¹. O complexo tem coloração azul e é quantificado em 565nm.

IV.3.2. ENZIMA NA FORMA IMOBILIZADA

Um sistema para monitorar a formação de catecol foi construído e dois eletrodos sendo um como referência e o outro o de trabalho. São adicionados sobre o sistema todos reagentes, e o catecol formado é amperometricamente monitorado a +300 mV vs Ag/AgCl⁷².

Um reator contendo a enzima imobilizada por ligação covalente via p-tetracloroquinona sobre esferas de vidro (*glass beads*), foi acoplado a um sistema FIA e o catecol monitorado a +450 mV vs ECS⁷³.

Sistema por injeção em fluxo, com detecção amperométrica⁷⁴, foi usado com a enzima imobilizada sobre platina, via derivatização com p-tetracloquinona. O potencial de +550 mV vs Ag/AgCl foi aplicado na determinação amperométrica de catecol. Vale ressaltar que os sistemas apresentados usam potenciais altos para detecção do catecol, o que pode ser inconveniente em trabalhos com amostras biológicas.

O uso de membrana contendo a enzima salicilato hidroxilase imobilizada, via ligação covalente cruzada com glutaraldeído, foi colocada em contato com um eletrodo de oxigênio, para determinação amperométrica do mesmo. O procedimento relaciona o consumo de oxigênio com a concentração de salicilato⁷⁵. Semelhante processo é usado em conjunto com um sistema de injeção em fluxo⁷⁶. A Concentração de salicilato foi determinada o usando-se um eletrodo íon seletivo para acompanhar o consumo de CO₂, que foi relacionado com a concentração de salicilato⁷⁷, sendo que a construção do biossensor tem similaridade com aquela empregada para o sensor de oxigênio anteriormente mencionada.

Um sistema envolvendo duas enzimas, a salicilato hidroxilase e a enzima glicose oxidase foi recentemente descrito⁷⁸. O catecol é oxidado via eletroquímica para o-quinona, que é então reduzida pela enzima glicose oxidase, regenerando-se catecol. A reoxidação do catecol resulta em um sinal de corrente amplificado.

IV.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O filme obtido foi de cor preta com morfologia superficial lisa e brilhante. A dopagem ou não do filme pelo $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ foi verificada por voltametria cíclica.

O eletrodo modificado foi submetido a uma varredura de potencial entre $-0,1$ e $+0,4$ V vs ECS, a uma velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

Os dados obtidos foram comparados com aqueles do eletrodo de carbono vítreo antes de ter sua superfície modificada.

Observa-se no voltamograma da Figura 8, dois pico redox em $0,08\text{V}$ e $0,16\text{V}$ (**A**), atribuído ao hexacianoferrato incorporado no filme, sendo que nenhum outro pico foi observado nesta faixa de potencial.

Nenhuma corrente de processo redox aparece nesta faixa de potencial, quando o eletrodo de carbono vítreo (**B**), ou o eletrodo modificado com filme de PPy/Cl (**C**), foram submetidos nas mesmas condições. Estas características observadas confirmam a incorporação do mediador hexacianoferrato do mesmo. A maior corrente capacitiva mostrada no voltamograma (**A**) pode ser atribuída ao aumento de superfície causada pela morfologia do filme obtido, sendo que esta é uma característica das condições de obtenção do filme. A baixa corrente capacitiva obtida, com o sistema modificado com o filme de PPy/Cl, pode ser justificada também em função da morfologia. Neste caso, o filme deve

se aproximar de uma área superficial bem próxima ao do eletrodo de carbono vítreo.

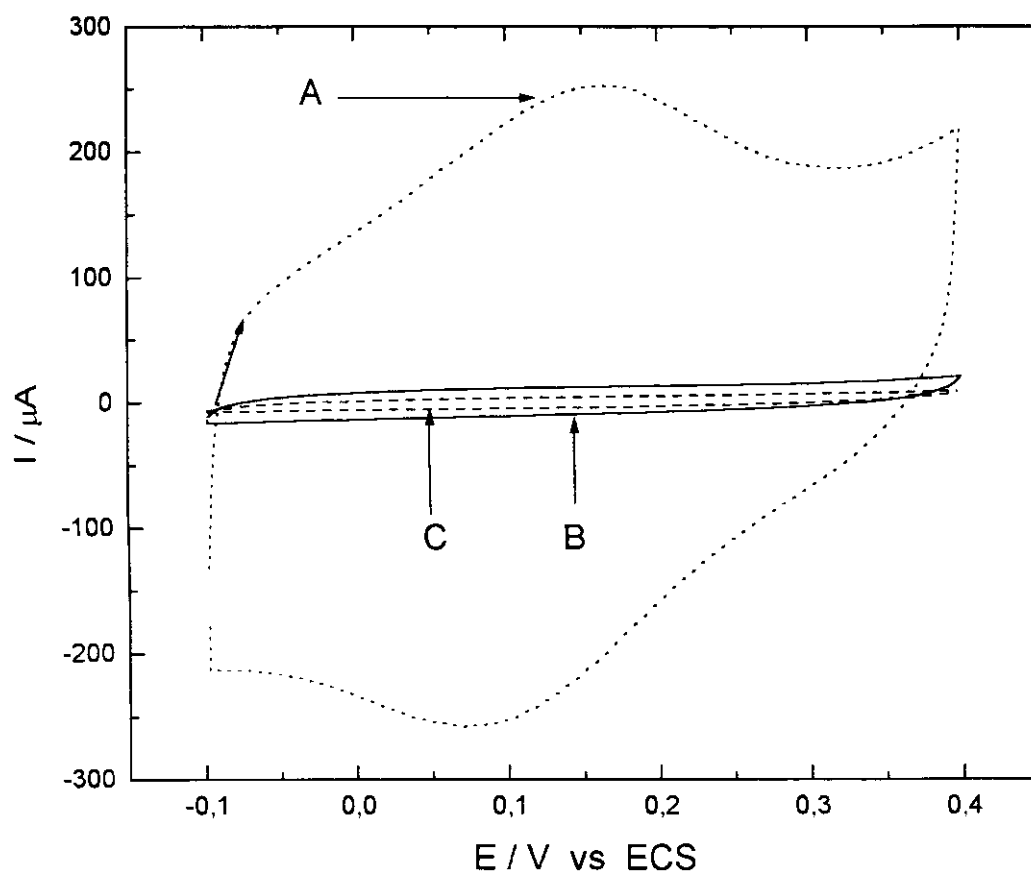


Figura 8. Voltamogramas cíclicos com o eletrodo de carbono vítreo (**A**) com filme PPY/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (**B**) com filme PPY/Cl, (**C**) sem modificação. Eletrólito suporte: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,4. Velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

Na Figura 9, são mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos sucessivamente em diferentes velocidades de varredura de potencial e nas mesmas condições fixadas. O gráfico inserido mostra a variação linear da corrente em função da velocidade de varredura de potencial, na faixa de -0,1 a +0,4 V, no intervalo de 5 a 50 mV s⁻¹.

O comportamento linear da corrente em função da velocidade de varredura de potencial, sugere que os ânions hexacianoferrato estão incorporados no filme desde o início de sua formação⁸¹ e fortemente aderidos na superfície do filme. A quantidade de corrente capacitiva mostrada pelos sucessivos voltamogramas depende de todo o processo e condições de obtenção do filme, envolvendo desde a limpeza da superfície do eletrodo base até a lavagem do filme após sua obtenção⁸².

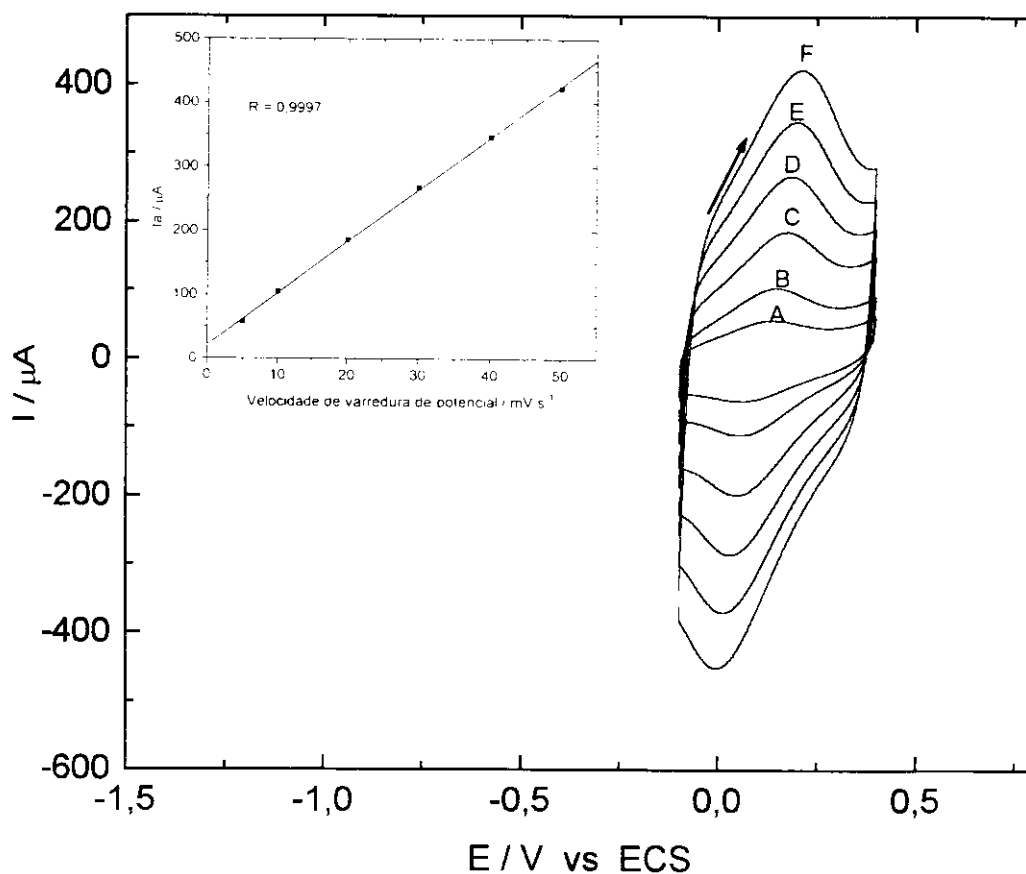


Figura 9. Voltamogramas cíclicos do filme ppy/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ obtidos a diferentes velocidades de varreduras de potencial, (A) 5, (B) 10, (C) 20, (D) 30, (E) 40 e (F) 50 mV s^{-1} . Inserido na figura um gráfico mostrando a dependência da corrente de oxidação com a velocidade de varredura de potencial. Solução tampão fosfato 0,1 mol l^{-1} pH =7,4 foi usado como eletrólito suporte.

O tempo de formação do filme teve influência sobre a espessura do filme, conseqüentemente sobre o processo difusional e também sobre a quantidade de mediador incorporado no filme.

Dados mostraram que o melhor filme em função do tempo de polimerização foi aquele obtido quando foram usados 100 segundos. A Figura 10, mostra os voltamogramas cíclicos obtidos, com filmes eletropolimerizados nas mesmas condições e tempos de eletropolimerizações diferentes.

Sabe-se que uma cadeia de polipirrol é de natureza rígida, o que dificulta uma proximidade entre os íons redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, por isso, a neutralidade de cargas produzida durante o processo redox é realizada pela entrada no filme de íons do eletrólito.

O maior ΔE_p (164mV) para o filme da Figura 10C (150 segundos), contra um ΔE_p de 134 mV para os filmes da Figura 10A e 10B, respectivamente 50 e 100 segundos, pode ser atribuído a um aumento da rigidez do filme, dificultando a interação entre os íons redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Pode-se ainda pensar no aumento da espessura do filme, aumentando também a distância difusional do cátion do eletrólito no filme e conseqüentemente o ΔE_p . Vale acrescentar que o filme com maior tempo de polimerização tem um aspecto opaco e é quebradiço o que não é conveniente para construção de biossensor. O biossensor construído com um filme obtido usando-se 50 segundos de

polimerização não responde amperométricamente, possivelmente devido á pequena quantidade de mediador incorporado.

Para filmes finos, a taxa de crescimento do filme depende diretamente da densidade de corrente⁸³. Taxa de crescimento do filme é variável também em função da resistência da solução eletrolítica, concentração do pirrol e potencial aplicado⁸⁴. Portanto, para se obter um filme por eletropolimerização, as variáveis concentração, potencial e densidade de corrente, devem ser controladas. Com estes dados decidiu-se pelo tempo de 100 segundos, para obtenção do filme a ser usado na construção do biossensor.

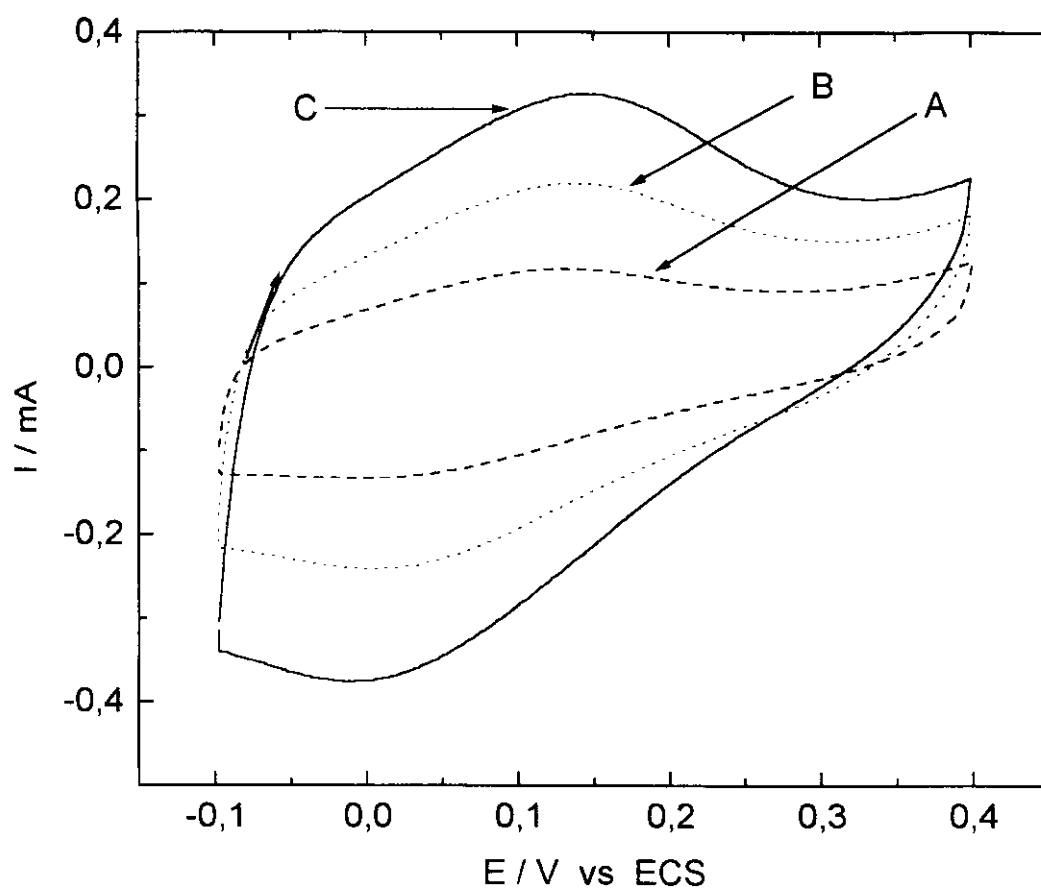


Figura 10. Voltamogramas cíclicos de filmes de polipirrol dopados com hexacianoferrato. (A) 50 (B) 100 (C) 150 segundos de polimerização em solução de ferrocianeto $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, contendo pirrol $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de potencial de 20 mV s^{-1} .

Verificou-se ainda, o comportamento do filme em função da variação de pH e da natureza do eletrólito suporte.

Pelos dados da Tabela 2, obtidos em soluções de diferentes valores de pH, podemos verificar que as correntes de pico, anódica e catódica apresentaram pequenas variações nos seus valores.

Tabela 2. Dados de corrente e potenciais obtidos em diferentes pH.

pH	*I _a (μ A)	**E _a (mV)	*I _c (μ A)	**E _c (mV)
6,8	381	178	430	20
7,4	403	166	425	30
8,1	398	174	399	80

* corrente em microamperes ** potencial em milivolts.
onde: I_a, I_c, E_a, E_c são respectivamente corrente e potencial de oxidação e redução do sistema.

Como pode-se observar a maior corrente de oxidação e menor potencial de oxidação foram obtidos quando o pH do meio é 7,4. Este pH, ocasionalmente está na faixa de valores requeridos como ótimo para se trabalhar com a

enzima salicilato hidroxilase, conforme dados que serão apresentados posteriormente.

Pelos voltamogramas da Figura 11, pode-se verificar que cátions de raio iônico menores do que o raio iônico do ferrocianeto não mudam significativamente o comportamento eletroquímico do filme (**A**) Na^+ (**B**) NH_4^+ . Para estes o valor do raio iônico está próximo de 0,2 nm. Cátions maiores, por outro lado, apresentam grande influência. O raio iônico do ferricianeto e do ferrocianeto são 0,4 e 0,5 nm, respectivamente⁸⁴. A neutralidade de carga durante o processo redox fica prejudicada, causada pela dificuldade de uma melhor difusão do cátion através do filme. Assim, o voltamograma cíclico (**C**), obtido com eletrólito contendo o cátion dimetilamônio (**DMA**), mostra um aumento no potencial médio, causando um deslocamento dos potenciais de pico do par redox.

Se o cátion hidratado tem menor raio de hidratação em relação ao dopante pode-se considerar que o mesmo tem sua difusão permitida com maior facilidade em relação a outros que possuam raios maiores do que aquele.

Isto significa que o comportamento eletroquímico do filme também pode ser alterado em função da natureza do eletrólito suporte.

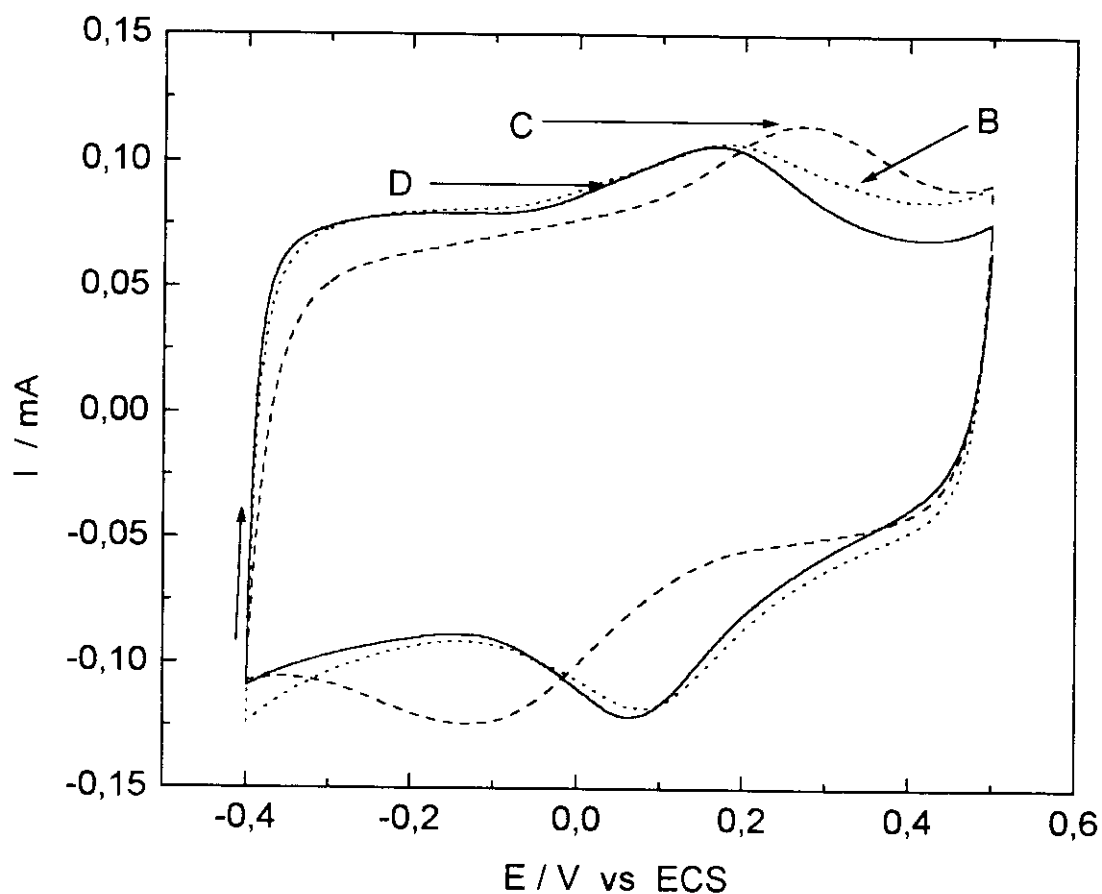


Figura 11. Voltamogramas cíclicos do filme de polipirrol dopado com hexacianoferrato. Diferentes eletrólitos (**A**) Na^+ (**B**) NH_4^+ (**C**) DMA. O ânion presente sempre foi o cloreto. Concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ do cátion. Velocidade de varredura de 20 mVs^{-1} .

IV.4.1. OXIDAÇÃO CATALÍTICA DO NADH

A literatura tem mostrado a importância de sistemas usados para eletrocatalisar, a potencial baixo, a oxidação de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido), uma vez que a oxidação do NADH ocorre à potencial elevado⁸⁵.

Um dos fatores limitantes da utilização das análises eletroquímicas em amostras complexas, é a interferência causada pela oxidação eletroquímica a potenciais elevados. Contornam-se em parte estes fatores pelo uso de processos eletrocatalíticos^{86,87}.

O NADH é o cofator usado por um grande número de enzimas pertencentes ao grupo das oxidoreduases. Esta é uma das razões que justifica o desenvolvimento de metodologias capazes e eficientes para determinação deste cofator envolvendo processos enzimáticos NADH dependentes.

A enzima salicilato hidroxilase, que converte salicilato, na presença de NADH e oxigênio para catecol, NAD⁺ e dióxido de carbono, tem sido usada para a determinação de salicilato. O consumo de NADH, ou de oxigênio, a formação de dióxido de carbono, ou de catecol, podem ser correlacionados com a concentração de salicilato.

A construção de um biossensor tendo a enzima salicilato hidroxilase imobilizada diretamente sobre um eletrodo de platina, foi recentemente descrita⁷⁴, sendo

discutido a relação entre a quantidade de catecol formada com a concentração de salicilato adicionado no meio reacional. O potencial ótimo para obtenção da maior corrente faradaica, sem interferência do NADH e do salicilato foi de +550 mV vs Ag/AgCl.

Entretanto, o potencial usado é elevado e pode ser responsável por problemas de interferências, principalmente, se usado em matrizes biológicas.

O uso de mediadores de elétrons tem sido uma técnica comum para diminuir o potencial aplicado em estudos com sistemas enzimáticos. Sistemas que permitem usar potenciais próximo de zero, objetivando-se amenizar os efeitos de interferências, tais como ácido ascórbico, cisteína e outros^{88,89}, têm norteado os estudos eletroquímicos envolvendo a construção de biossensores amperométricos.

Diferentes arranjos de sensores e de mediadores eletrônicos têm sido desenvolvidos e utilizados para estudar o comportamento do cofator NADH^{90,95}.

O hexacianoferrato é um dos mediadores usados na eletrocatalise com esta finalidade^{96,98}.

A princípio, pode-se pensar que o biossensor desenvolvido no nosso trabalho, respondesse também para NADH, no entanto, os resultados mostraram que o sistema não foi sensível para NADH, no entanto, possui uma grande sensibilidade para catecol, no potencial de 150 mV vs ECS.

A ausência de eletrocatalise para o NADH pode ser observada na Figura **12**. Nenhuma corrente catalítica foi registrada quando se adiciona NADH e faz-se a voltametria cíclica numa faixa de potencial entre -0,2 e 0,4V. Este comportamento pode ser atribuído ao impedimento espacial da molécula de NADH (PM = 709,4). Sendo uma molécula grande não difunde através do filme enzimático colocado sobre o filme de polipirrol. Deste modo, o sistema não responde satisfatoriamente a NADH.

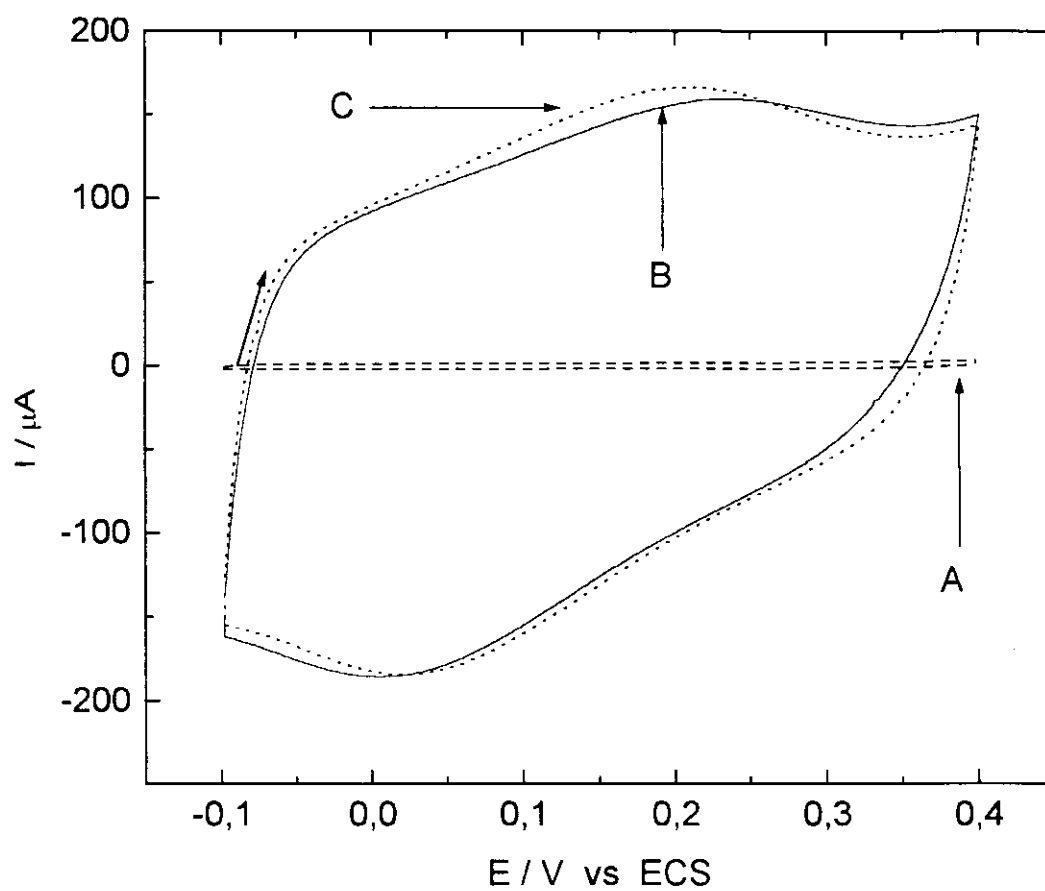


Figura 12. Voltamogramas cíclicos obtidos com: eletrodo de carbono vítreo (**A**), e o biossensor na ausência (**B**) e presença (**C**) de NADH $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4. Velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

IV.4.2. ELETROCATÁLISE DO CATECOL

O mesmo procedimento usado para verificar o comportamento do biossensor em relação a presença de NADH, foi empregado para estudar o comportamento de catecol.

Como pode ser observado pela Figura **13**, ao adicionar-se solução de catecol no meio reacional, já contendo NADH, uma corrente catalítica é obtida.

A eletrocatálise do catecol (PM = 100) é possível levando-se em conta que é uma molécula pequena em relação à de NADH, sendo possível sua difusão pelo filme enzimático. Trabalho anterior mostrou que a difusão de ânions pelo filme de polipirrol dopado com cloreto é possível⁹⁹. O autor mostra que o processo redox para moléculas orgânicas neutras, como hidroquinona e catecol, é melhor definido quando se usa um eletrodo de platina modificado com PPY-Cl, em relação ao não modificado.

A pequena corrente de redução mostrada na figura pode ser atribuída à redução de o-quinona para catecol.

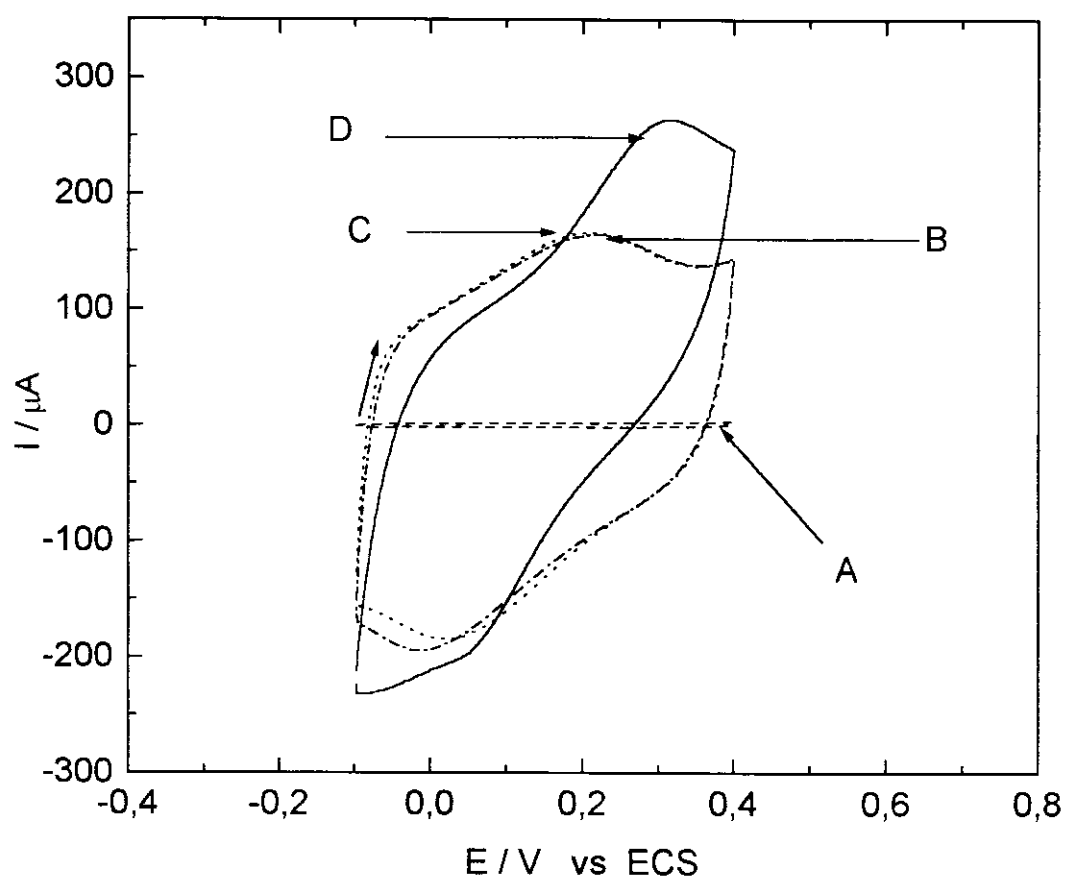


Figura 13. Voltamogramas cíclicos obtidos em uma solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$. (**A**) carbono vítreo, (**B**) biossensor, (**C**) biossensor com adição de NADH, (**D**) biossensor com adição de catecol. Velocidade de varredura de 20 mV s^{-1}

A Figura 14, mostra um cronoamperograma relacionando-se as correntes de oxidações catalítica que são obtidas quando NADH e catecol são adicionados, separadamente, numa solução de tampão fosfato, aplicando-se um potencial de 150 mV vs ECS.

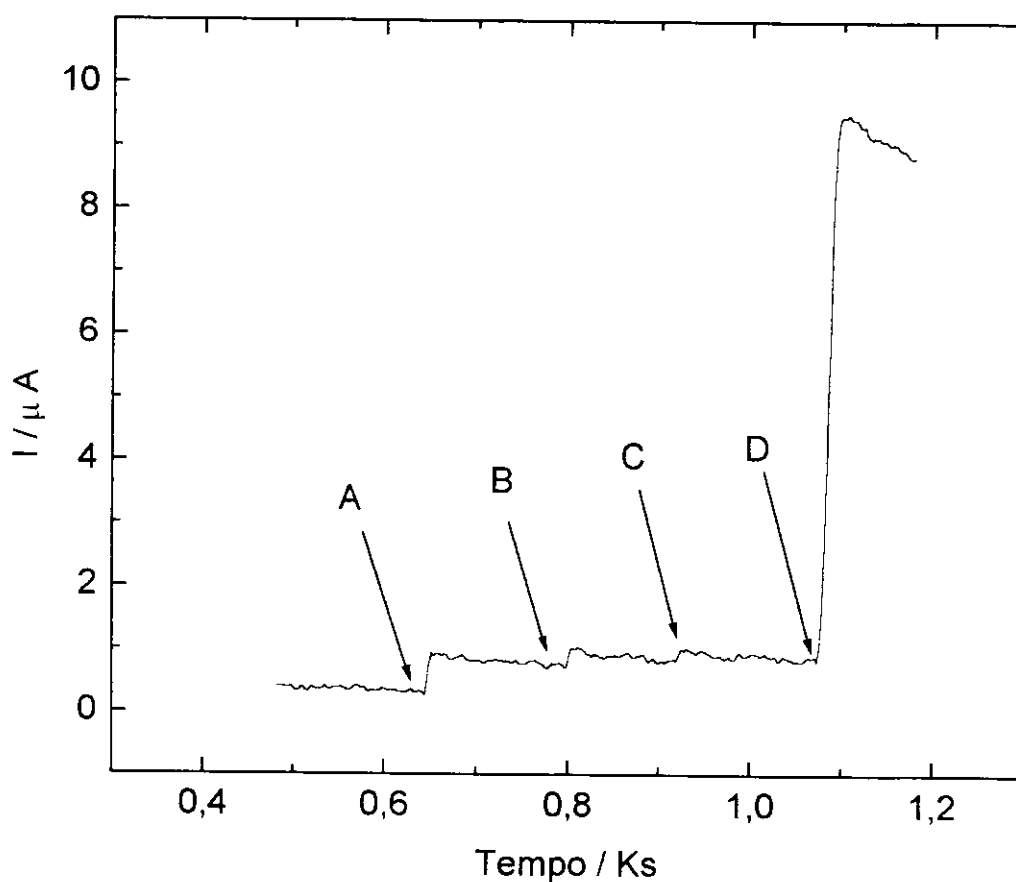


Figura 14. Cronoamperograma obtido com o biossensor em solução tampão de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4 (5,0 mL). Potencial aplicado de 150mV vs ECS. Adição de 50 μL de: solução de NADH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (A,B,C). solução de catecol $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (D).

Estes resultados foram decisivos para a utilização do biossensor na determinação de salicilato, usando-se a corrente de oxidação do catecol produzido pela reação enzimática, para determinação da concentração de salicilato no meio.

A sensibilidade do biossensor para salicilato pode ser verificada pelos dados obtidos quando foram adicionadas, solução de NADH e em seguida, a solução de salicilato em substituição à solução de catecol. A Figura **15**, mostra os níveis de corrente obtidos.

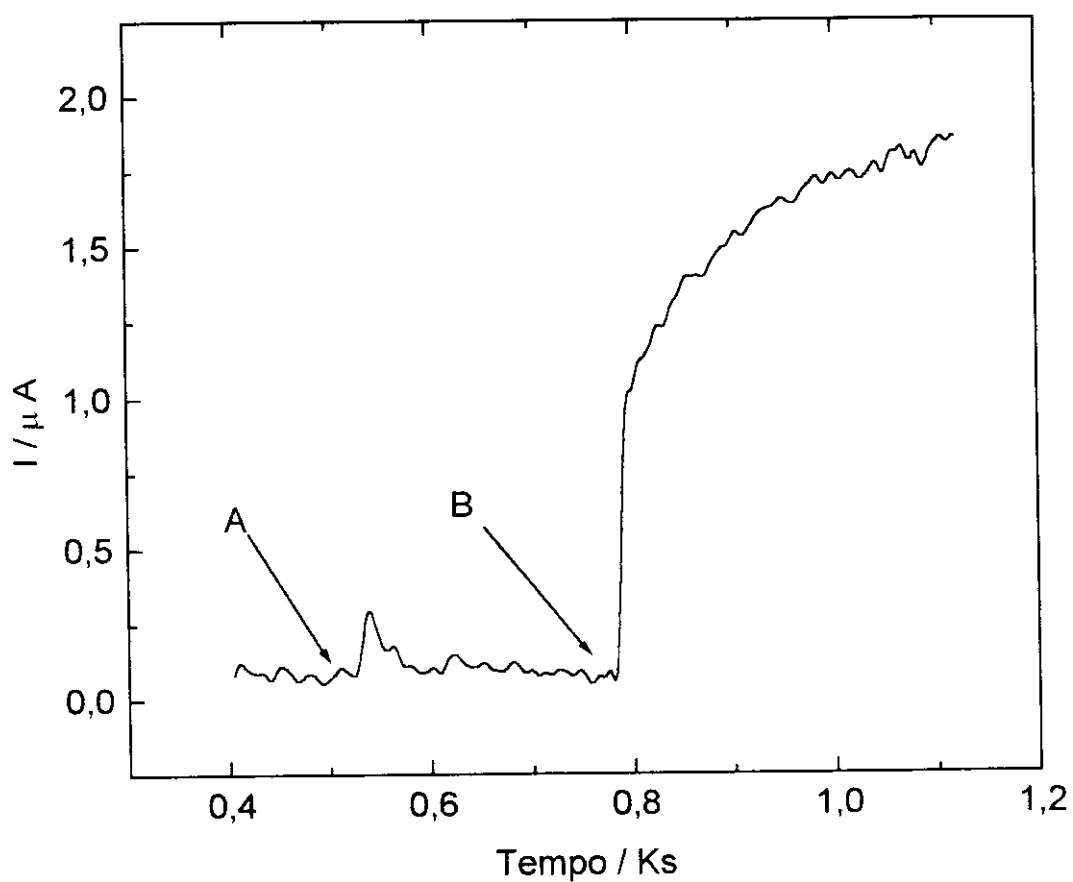


Figura 15. Cronoamperograma obtido com o biossensor em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$. Adição de $50 \text{ }\mu\text{L}$ de : (**A**) solução de NADH $4,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. (**B**) solução de salicilato $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Potencial aplicado de 150 mV vs ECS .

A Tabela 3, mostra os dados obtidos pelo sistema em termos de níveis de corrente, quando a ordem de adição da solução de salicilato e da solução de NADH é invertida. Em (A) são mostrados os dados quando é adicionado, em primeiro lugar, a solução de salicilato e em seguida a solução de NADH. Em (B) o inverso.

Pode-se afirmar, por estes resultados que a ordem de adição não tem influência sobre o nível de corrente obtida pelo sistema, confirmando-se que nenhum processo químico e/ou eletroquímico ocorre quando o biossensor é colocado na presença dos reagentes em separado.

Tabela 3. Influência da ordem de adição dos reagentes.

Seqüência de adição	*Corrente obtida após adição de:	
	NADH	Salicilato
A	0,173	1,77
B	0,172	1,78

* ΔI em microamperes

IV.4.3. INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE NADH

Na análise de salicilato, empregando-se sistema FIA, observou-se que a quantidade de salicilato oxidado depende da concentração de NADH^{86,87}.

Realizou-se o estudo para encontrar a melhor relação entre, a quantidade de NADH e salicilato, que poderia ser usada empregando-se o sistema proposto. Os resultados são mostrados na Figura 16.

A melhor relação, entre a quantidade de NADH e a de salicilato é de aproximadamente quatro para um. Conforme pode-se visualizar pelo gráfico, com esta relação obtém-se maior velocidade de ~~de~~ oxidação de salicilato. Este controle não apresenta maiores dificuldades, uma vez que as soluções de interesse podem ser preparadas facilmente antes de seu uso.

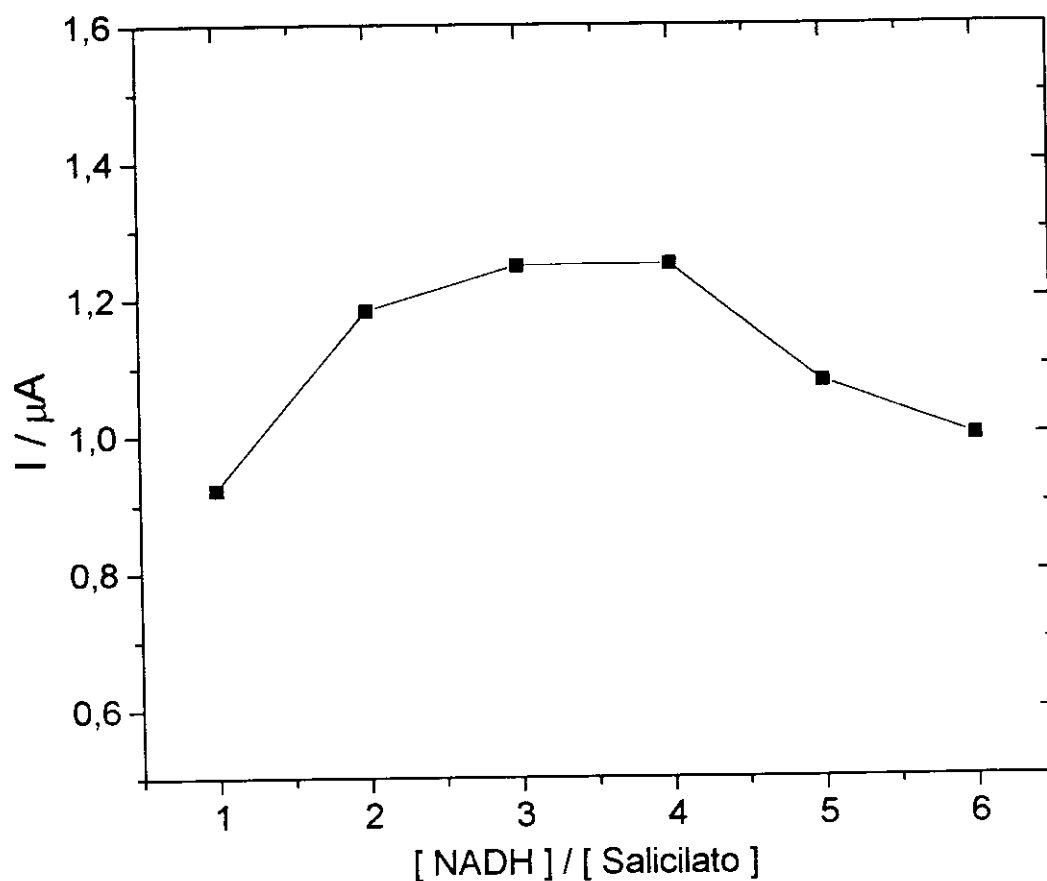


Figura 16. Relação entre as quantidades de NADH e de salicilato no meio, com a resposta do biossensor. Potencial aplicado de 150 mV vs ECS. Concentração de salicilato $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

IV.5. DETERMINAÇÃO DE SALICILATO COM O BIOSSENSOR

Todas as determinações de salicilato foram realizadas, aplicando-se um potencial de trabalho, na célula eletroquímica, contendo o eletrólito suporte. Após estabilização da corrente capacitiva do sistema, faz-se a adição da solução de interesse.

Em seguida, com auxílio de um agitador magnético faz-se a homogeneização da solução. Deixa-se o sistema em repouso por 20 segundos. Esse tempo foi deixado para que somente o processo difusional seja o responsável pela chegada de substrato à superfície do biossensor e pela saída de produtos da reação enzimática desta mesma superfície.

A adição do cofator NADH, no meio reacional, pode ser realizada por diferentes procedimentos. Adicionar em etapa separada à do analito, ou simultaneamente com este.

Em função dos resultados anteriores, e para facilidade operacional, todas as amostras e padrões foram preparadas, antes do uso contendo NADH, na relação adequada.

Atribui-se a corrente produzida no sistema, após adição de salicilato, como resultante da eletrocatalise de catecol produzido pela reação enzimática.

IV.6. CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSENSOR

Para um melhor comportamento do biossensor, alguns parâmetros foram estudados levando-se em conta aqueles que apresentam maior influência sobre processos enzimáticos.

IV.6.1. EFEITO DO pH

O pH ótimo para a enzima *Salicilato Hidroxilase (salicilato 1- monooxigenase EC 1.14.13.1) recomendado pelo fornecedor é de 7,6 a 30°C. Outros trabalhos^{75,77}, que usam a enzima imobilizada com glutaraldeído, citam o valor de pH ótimo, entre 6,5 e 7,6. Para o biossensor em estudo foi verificado seu comportamento no intervalo de pH = 6,8 a pH = 8,1. Os resultados obtidos para diversas concentrações de salicilato e com o mesmo tipo de tampão são mostrados na Figura 17.

* O fornecedor define como Unidade para esta enzima como: Uma unidade deve converter 1,0 micromol de salicilato e β -NADH para catecol e β -NAD⁺ por minuto em pH = 7,6 numa temperatura de 30°C.

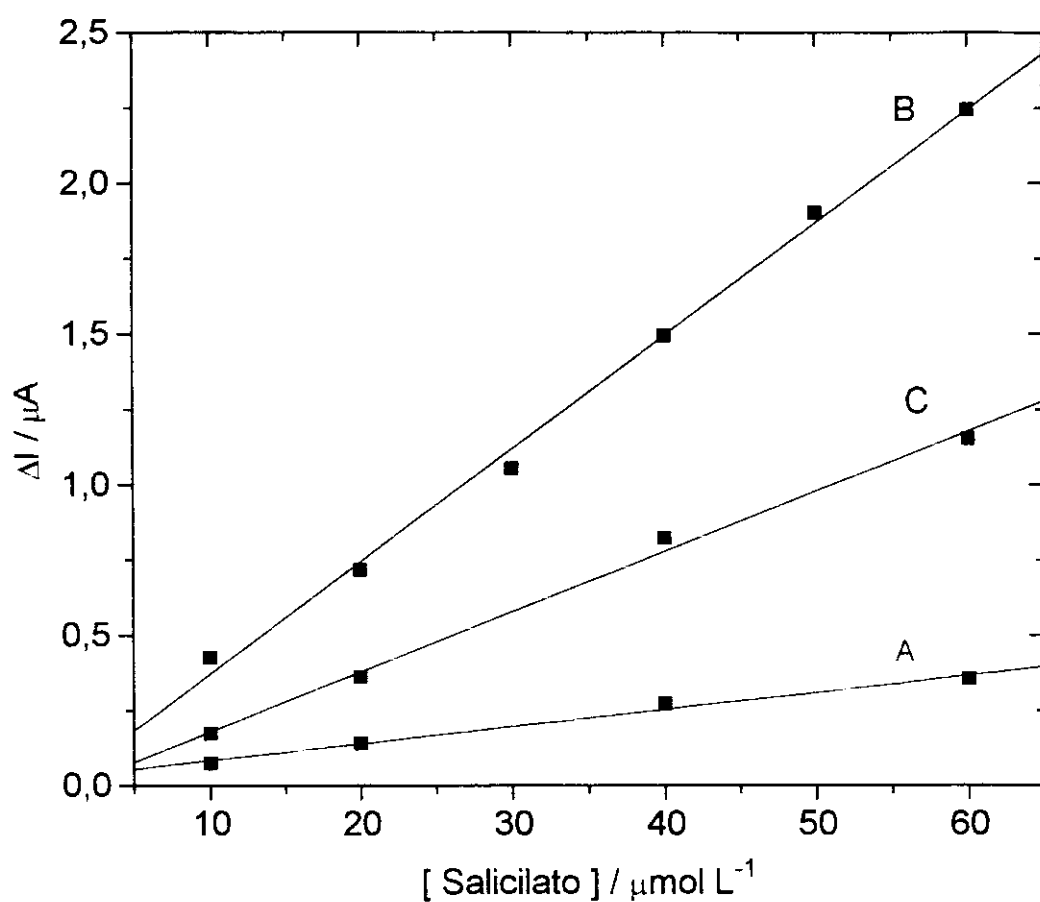


Figura 17. Variação da corrente em função do pH. As soluções tiveram seus valores de pH acertados em: (**A**) 6,1, (**B**) 7,4, e (**C**) 8,1. Potencial aplicado de 150 mV vs ECS.

IV.6.2. EFEITO DA TEMPERATURA

A falta de controle de temperatura no meio reacional, durante a realização das medidas pode, em alguns processos enzimáticos, provocar erros na ordem de 10% por grau de temperatura.

Uma temperatura de 30°C é recomendada, pelo fabricante da salicilato hidroxilase, como sendo ótima para se fazer uma análise com a enzima solúvel.

O uso da temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$), mantém cerca de 70% da atividade catalítica⁷⁹, em relação a sua atividade na temperatura ótima.

Em função destes dados e simplicidade do sistema, optou-se para realizar todas as medidas na temperatura ambiente ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$).

IV.6.3. TEMPO DE RESPOSTA DO BIOSENSOR

O tempo de resposta do biossensor é de aproximadamente 40 segundos. Outro trabalho⁷⁶, que usa eletrodo de oxigênio tipo Clark e imobilização da enzima com glutaraldeído, apresenta um tempo de resposta de dois minutos e o tempo de análise para cada amostra, é de seis minutos. O menor tempo de resposta para o biossensor em estudo permite um maior número de dados por unidade de tempo, o que pode ser vantajoso, se acoplado a um sistema de análise em fluxo.

Conceitua-se como tempo de resposta do biossensor como sendo o intervalo de tempo que é necessário, desde o momento de adição do substrato (**A**), até aquele que se observa estabilização da corrente (**B**). Conforme pode ser observado pela Figura **18**, a diferença de corrente entre o ponto (**B**) e o ponto (**A**), corresponde a uma determinada concentração do analito.

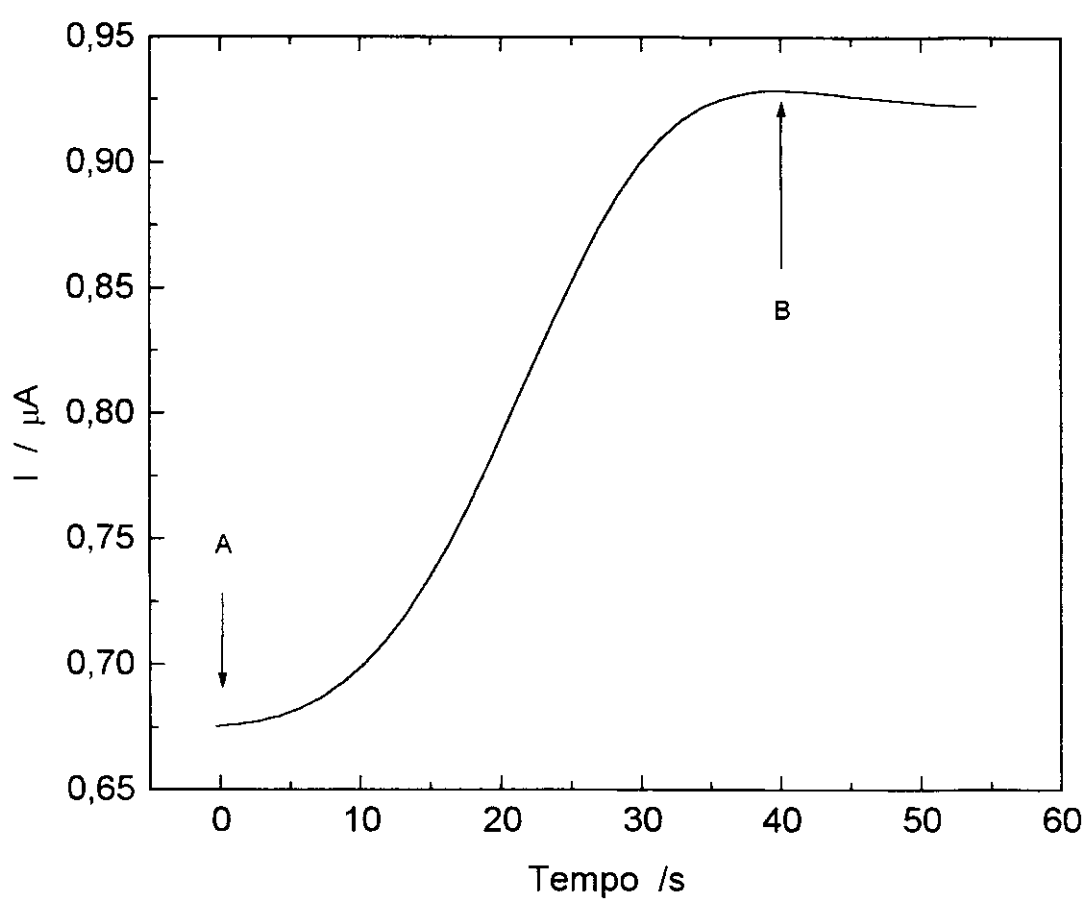


Figura 18. Tempo de resposta do biossensor após adição de 50 μL de solução de salicilato $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ com NADH $4,0 \cdot 10^{-2}$. Potencial aplicado de 150 mV vs ECS. Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,40.

IV.6.4. ESTABILIDADE DO BIOSSENSOR

A resposta do biossensor foi mantida por mais de 10 dias, guardado em geladeira, após realizar no mínimo 50 medidas. O teste foi realizado usando-se solução padrão.

IV.6.5. OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO

Após ajuste dos principais parâmetros do biossensor, procedeu-se a uma avaliação do mesmo, em determinações de salicilato em amostras reais.

Na célula eletroquímica foi aplicado um potencial de 150 mV vs ECS. Após estabilização da corrente residual em torno de três minutos, adicionou-se solução padrão contendo o cofator, para obtenção da concentração desejada de salicilato. Fez-se a homogeneização da solução e deixou-se o sistema em repouso por 30 segundos.

Em seguida, fez-se o acompanhamento da corrente obtida até sua estabilização. Nova alíquota do padrão foi adicionada e todo procedimento é repetido. Um amperograma típico é apresentado na Figura 19. O biossensor apresentou boa sensibilidade na determinação de salicilato Figura 20, onde é apresentada a curva de calibração, cuja faixa linear de resposta é de $1,2 \cdot 10^{-5}$ a $1,3 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹. A variação da corrente em função da concentração é dada por:

$I = (- 0,044 \pm 0,025) + (0,0114 \pm 0,0003) [\text{salicilato}]$, com um coeficiente de correlação $R = 0,9986$. Para valores de concentrações maiores que $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, verifica-se uma curvatura que pode ser explicada pela saturação do sistema.

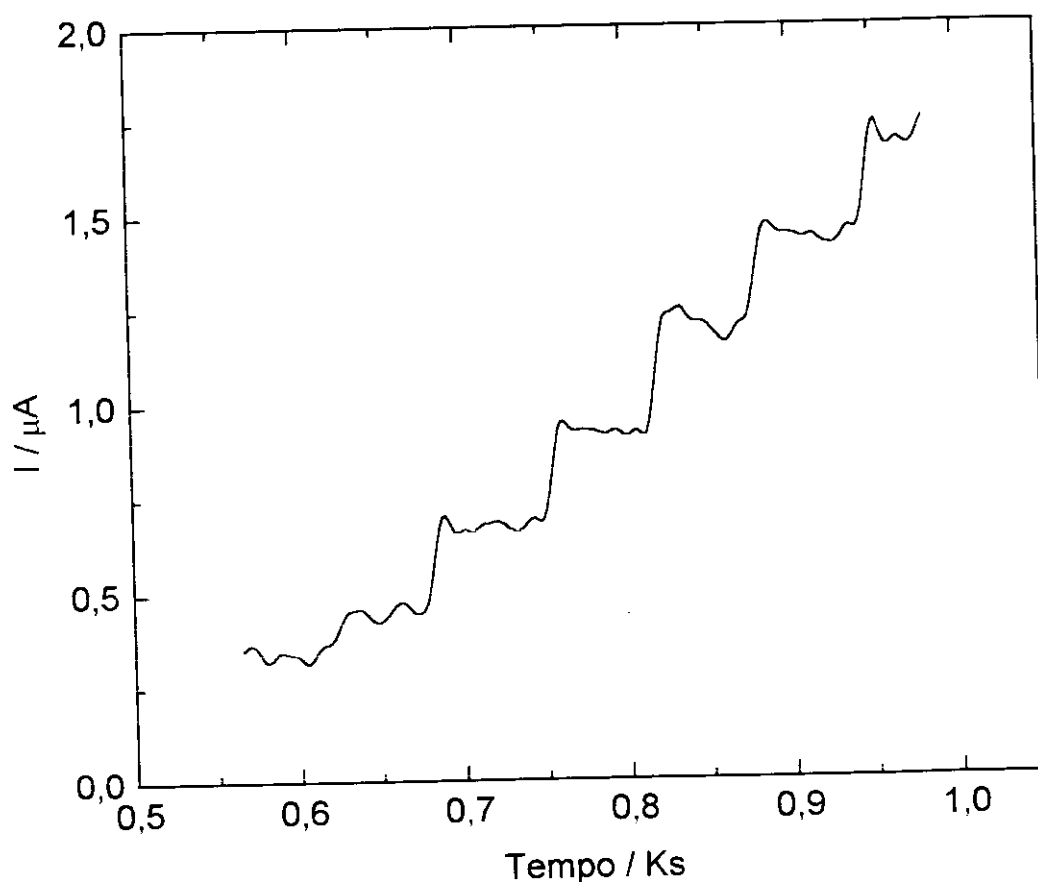


Figura 19. Curva amperométrica típica obtida com o biossensor em 5,0 mL de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$. Potencial aplicado de 150mV vs ECS. Adições sucessivas de 50 μL de uma solução $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em salicilato e com $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NADH.

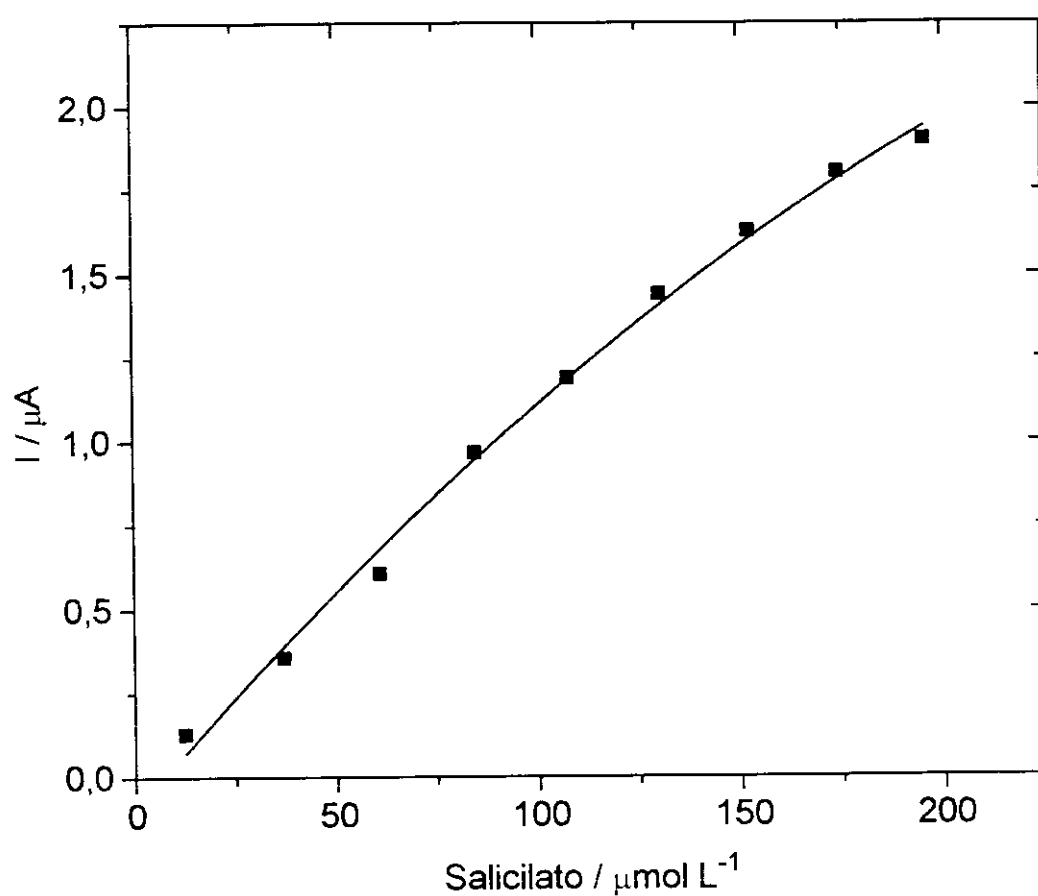


Figura 20. Curva de calibração para salicilato. Dependência da corrente obtida com o biossensor para diferentes concentrações de salicilato. Potencial aplicado de 150 mV vs ECS.

IV.7. APLICAÇÃO ANALÍTICA DO BIOSSENSOR

Após avaliação do desempenho analítico do biossensor, foram feitas análises de comprimidos de ASPIRINA[®], AAS[®] e MELHORAL[®]. Os resultados foram comparados com os do método colorimétrico, do "Kit" fornecido pela Sigma Chemical Co, que é semelhante ao método oficial da farmacopéia brasileira.

IV.7.1. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE COMPRIMIDOS

Todas marcas de comprimidos apresentavam um valor nominal de 500,0 mg de ácido acetilsalicílico por comprimido.

Tabela 3. Determinação direta da quantidade de ácido acetilsalicílico após hidrolisado para salicilato.

AMOSTRA	Salicilato (%) ^a		
	Colorimétrico (KIT SIGMA)	Biossensor Desenvolvido	Nominal
ASPIRINA [®]	83,6 ± 1,0	86,7 ± 1,3	83,0
MELHORAL [®]	87,2 ± 1,4	86,2 ± 1,6	88,0
AAS [®]	87,0 ± 1,3	86,9 ± 0,8	87,0

*média e desvio de três determinações para cada amostra.

Como pode ser visto pelos resultados da Tabela 3, os dados apresentam uma boa correlação entre os métodos.

IV.8. CONCLUSÕES

Pela primeira vez foi desenvolvido um sistema enzimático para determinação de salicilato, utilizando-se um processo diferente para imobilização do mediador e da enzima salicilato hidroxilase.

Uma exelente aderência dos filmes sobre o eletrodo foi conseguida, necessitando-se de polimentos para remoção dos mesmos.

O potencial de 150 mV vs ECS usado nas medidas amperométricas é próximo aos valores de potenciais adequados, para sistemas enzimáticos, pertencentes ao grupo das oxidoredutases. Potenciais baixos, amenizam os efeitos por interferências provenientes da redução de oxigênio molecular e a oxidação de compostos como ascorbato, uriato e paracetamol não deverão contribuir para o sinal da resposta⁸⁵.

Os valores encontrados utilizando-se o biossensor são semelhantes aos do método colorimétrico. Mesma tendência de resultados foi encontrada anteriormente, para a análise de aspirina, empregando-se eletrodo íon seletivo^{62,63}. FIA com detecção potenciometria, e Bristish Pharmacopeia (B.P.Methods)⁶³, quando usados para análise de ASPIRINA e AAS obteve valores muito próximos àqueles obtidos neste procedimento.

Com o método proposto, a determinação do produto hidrolisado das amostras, é direto.

É um procedimento extremamente simples, podendo ser empregado com vantagens, principalmente, naquelas situações onde grande número de amostras precisam ser analisadas.

O pequeno volume de amostra requerido, comparado aos métodos colorimétricos proporciona a utilização do método para análise de amostras de volume reduzido.

O método não requer equipamentos sofisticados permitindo sua utilização em análise de rotina.

Finalmente, os resultados obtidos com a nova metodologia é superior em termos de sensibilidade em relação às outras metodologias existentes.

Como desvantagens do sistema pode-se mencionar a necessidade de controle de pH, sendo este limitado a uma pequena faixa para que o sistema mantenha uma resposta razoável e o controle da relação entre a quantidade de NADH e de salicilato no meio.

CAPÍTULO V

BIOSSENSOR PARA GLICOSE

V.1. IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

A determinação de glicose em matrizes biológicas é uma das principais rotinas de análises de todos laboratórios clínicos.

Não é menos importante a determinação deste composto em uma variedade de produtos industrializados e/ou de origem natural.

Visualizar a importância do desenvolvimento de técnicas para determinação de glicose, que sejam rápidas, precisas, econômicas e preferencialmente de manuseio simples, não é difícil, levando-se em conta o grande número de indivíduos que são acometidos de enfermidades envolvendo quantidades anormais deste metabólito no organismo.

Procedimentos analíticos que possibilitem análises em tempos reais, aliados à facilidade e simplicidade de execução é uma busca constante, principalmente, na área médica.

Mundialmente, o número exato de diabéticos não é conhecido, porém estima-se que entre mil indivíduos, sete sofrem desta enfermidade e destes, três pertencem à classe do tipo **I**, ou seja, indivíduos que não produzem qualquer quantidade de insulina. Nestes casos, a administração é necessária de duas a quatro vezes por dia, sendo talvez a grande dificuldade existente¹⁰⁰.

Recursos técnicos para determinar o nível de glicose no sangue, acoplado a mecanismos de administração automática de insulina são inexistentes.

O uso indevido da insulina leva a estados de hiperglicemia ou de hipoglicemia. Em qualquer destas situações os cuidados médicos são necessários para um bom diagnóstico e administração da correta dose de insulina.

A Figura 21, mostra a evolução do nível de glicose no sangue em dois indivíduos, sendo um deles normal e o outro diabético.

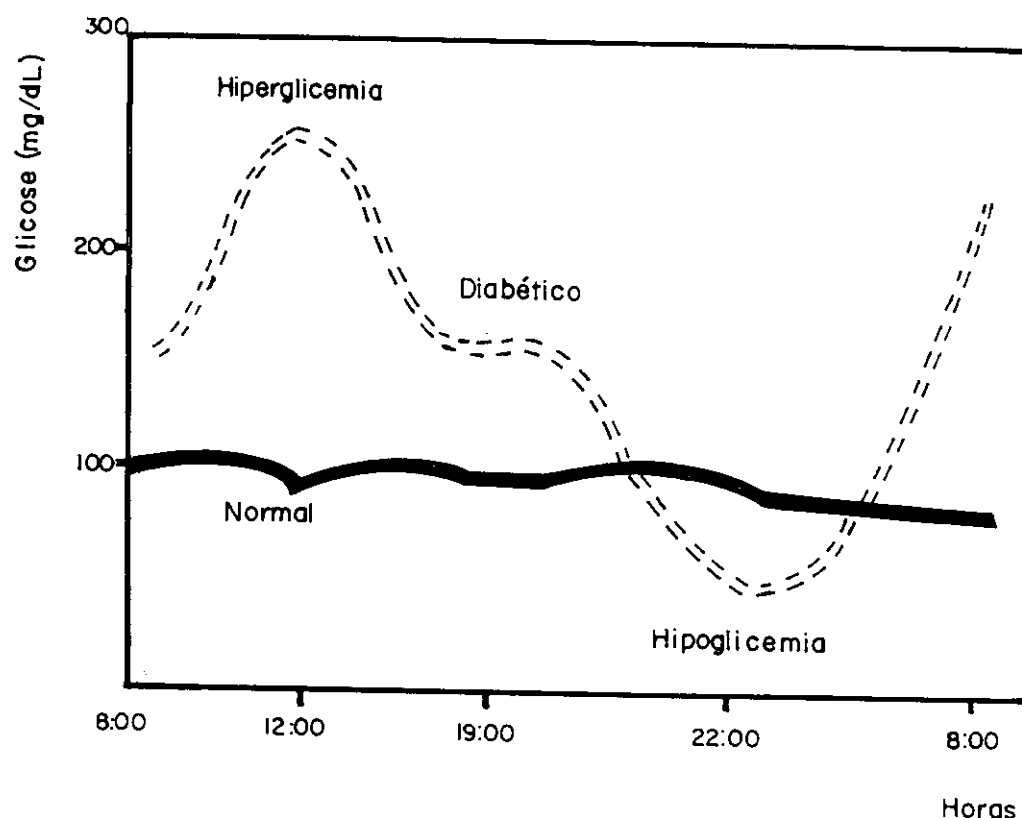


Figura 21. Evolução do nível de glicose no sangue. Indivíduo Normal (A), diabético (B)¹⁰⁰

V.2. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

Alguns "Kits" têm sido comercializados para avaliação colorimétrica do nível de glicose na urina. É uma análise ineficiente porque não retrata a realidade, uma vez que os dados obtidos, são posteriores aos efeitos causados no organismo.

Pode-se também, mencionar que a outra desvantagem está relacionada com a decomposição dos reativos adsorvidos, geralmente em fitas de papel, pela ação da luz, umidade e calor.

Assim, as metodologias com maior aceitação, são aquelas que podem retratar, em tempo mínimo, o nível de glicose no sangue.

Usando-se uma gota de sangue, pode-se obter visualmente e/ou com ajuda de equipamentos eletrônicos, a concentração de glicose no mesmo.

O problema consiste naqueles casos onde há necessidade em realizar até oito análises diárias.

Uma solução para monitorar os níveis de glicose no organismo, por meio de sensores, é o acoplamento de sistemas que mantêm o nível de insulina adequado no organismo, sendo feito automaticamente.

V.3. REAÇÃO DA GLICOSE CATALISADA PELA ENZIMA

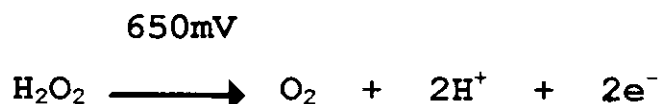
A enzima glicose oxidase em presença de oxigênio converte glicose em ácido glicônico e peróxido de hidrogênio.

As análises enzimáticas de glicose, envolvendo a quantificação do consumo de oxigênio ou a determinação de peróxido de hidrogênio formado durante a reação, são os procedimentos mais empregados. O mecanismo das reações envolvidas no processo, bem como os problemas relacionados com os altos potenciais necessários para monitoramento do consumo de O_2 ou produção de H_2O_2 , são discutidos detalhadamente na literatura⁸⁵. A metodologia consistindo-se no monitoramento de oxigênio via redução requer um potencial de $-0,6$ V vs Ag/AgCl. Este potencial provoca muitos problemas com o material do eletrodo.

A determinação amperométrica de H_2O_2 é outro procedimento que também tem sido empregado. O mecanismo envolvido é representado pelas seguintes equações:



Na superfície do eletrodo metálico,



O potencial de 650mV é suficientemente alto para oxidar outras substâncias endógenas, como por exemplo, o ácido ascórbico.

Biossensores para determinação de glicose, que empregam mediadores eletrônicos, oferecem vantagens, pois permitem uma troca eletrônica mais eficiente entre o centro ativo da enzima e o eletrodo, reduzindo aqueles potenciais.

O processo envolvido consiste na redução da enzima pelo substrato e a conseqüente oxidação da enzima pelo mediador de elétrons, sendo que a oxidação do mediador é realizada eletroquimicamente.

A transferência eletrônica direta entre enzima e eletrodo não ocorre com eficiência, entretanto, o processo fica rápido e eficiente se um mediador de elétrons é utilizado para efetuar esta transferência⁸⁵.

V.4. ELETRODO PASTA DE CARBONO

O carbono na forma de grafite é um material de baixo custo, versátil, de fácil manuseio, resposta voltamétrica estável, correntes residuais baixas e faixa de potencial anódico relativamente ampla em relação aos materiais clássicos, usados na construção dos diferentes tipos de sensores eletroquímicos¹⁰¹.

As recentes descobertas envolvendo a composição de grafite em pó, com outros materiais, como por exemplo a

sílica gel modificada¹⁰², torna este campo de pesquisa uma alternativa de grande importância para a preparação de eletrodos quimicamente modificados bem como a construção de biossensores.

Estas propriedades credenciam este material para ser usado na construção de eletrodos quimicamente modificados na forma de pasta de carbono¹⁰¹.

Trabalhos^{103,104,105}, sobre o assunto mostram o grande interesse por esta nova área de pesquisa, bem como o grande campo de aplicações.

V.5. MEDIADOR ELETROQUÍMICO PARA BIOSSENSOR DE GLICOSE

Técnicas diversas são descritas na literatura para imobilização destas espécies nas superfícies de diversos sensores.

Dentre os mediadores mais utilizados citam-se: ferroceno e derivados, derivados de quinona¹⁰⁶ e sais orgânicos condutores¹⁰⁷.

O ferroceno e seus derivados^{108,111} têm obtido atenção especial na construção de biossensores amperométricos.

O ferroceno tem se mostrado como o mais versátil e adequado para construção destes dispositivos, possibilitando inclusive, o aparecimento de dispositivo comercial, portátil, do tamanho de uma caneta, para determinação de glicose. Ele não é tóxico e não apresenta contra-indicação, mesmo se ingerido em quantidade relativamente elevada¹¹². Esta

biocompatibilidade do ferroceno pode ser importante para o desenvolvimento de dispositivos a serem implantados em humanos.

Alguns trabalhos têm sido publicados mostrando a utilização de sílica gel, ou zeólito como suporte inerte, que pode ser empregada para imobilizar espécies mediadoras de elétrons e na construção de sensores de pasta de carbono^{23,25}.

O uso destes materiais em processos catalíticos, pode ser importante, devido às suas características como grande área superficial, porosidade, facilidade de imobilizar mediadores eletrônicos e boa resistência mecânica¹¹³.

V.6. BIOSENSOR DE PASTA DE CARBONO PARA GLICOSE

O biossensor de pasta de carbono mais estudado é sem dúvida, o usado para determinação de glicose, em diferentes matrizes.

O interesse é justificado pelo uso deste dispositivo, na área clínica/médica, para determinações de glicose, principalmente, nos casos de pacientes portadores de diabetes, onde os resultados tem que ser obtidos com relativa rapidez.

O primeiro biossensor tipo pasta de carbono, utilizando-se uma mistura de sílica gel modificada com mediador e enzima, para construção de um

biossensor para determinação de glicose, foi desenvolvido neste trabalho.

V.7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.7.1. ESTUDO DAS PROPRIEDADES REDOX DA STFc

Inicialmente, verificou-se o comportamento eletroquímico da pasta de carbono preparada com **ST**, **STFc** e **STFcEz**, por voltametria cíclica.

A faixa de potencial entre 0 e 0,5 V foi usada para se fazer a varredura de potencial para os diferentes tipos de pasta.

Na Figura **21A**, é mostrado o voltamograma cíclico obtido quando a pasta foi preparada com **ST**. Pode-se verificar que nesta faixa de potencial não apresenta nenhum pico de corrente.

Quando a pasta de carbono contendo a **STFc** em sua composição, foi submetida às mesmas condições voltamétricas, aparecem dois picos de correntes, como pode ser visto pelo voltamograma da Figura **21B**.

O valor de 0,30 V vs ECS, para o potencial médio, sugere que o processo redox pode ser atribuído ao par redox $\text{Fe(II)Cp} / \text{Fe(III)Cp}$.

Semelhante comportamento foi verificado, quando a pasta de carbono é preparada com **STFcEz**. Os dados são mostrados pelo voltamograma da Figura **22C**.

A menor corrente de pico observada em relação à **21B** (**STFc**), indica que menor quantidade de mediador está imobilizada juntamente com a enzima.

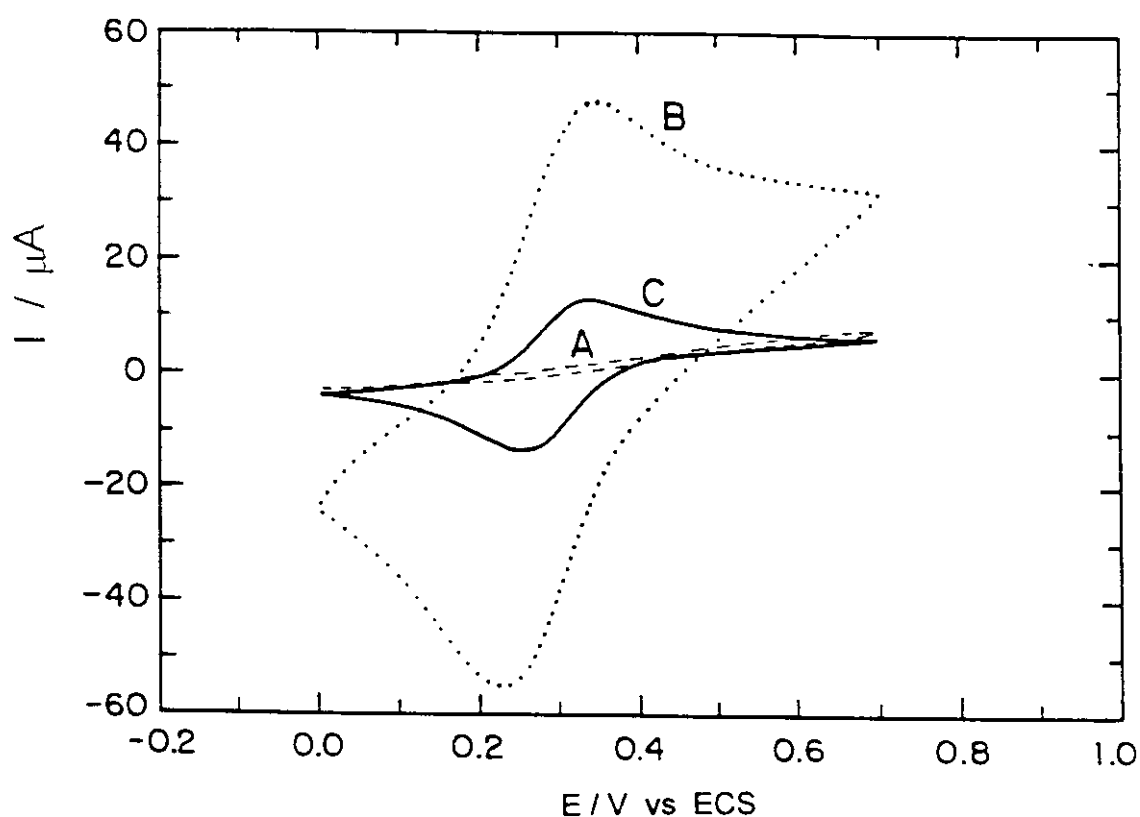


Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos com sensor tipo pasta de carbono com (**A**) **ST**, (**B**) **STFc**, (**C**) **STFcEz**. Eletrólito suporte tampão fosfato $0,025 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,8$. Velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

V.7.2. INFLUÊNCIA DO ELETRÓLITO SUPORTE

A natureza do cátion não afeta o potencial médio (E_m) do processo redox como pode ser analisado pelos dados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Efeito da natureza do cátion do eletrólito suporte, sobre a resposta voltamétrica do sensor tipo pasta de carbono com **STFc**.

Cátion*	E_m (mV)	ΔE_p (mV)	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)
Dimetilamônio	310	118	4,9	5,6
Amônio	306	102	6,6	7,1
Lítio	304	100	6,9	7,3
Potássio	302	98	7,5	8,5
Sódio	298	104	7,2	7,9

*Todas as soluções foram preparadas a partir de sais com ânion cloreto e com uma concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Velocidade de varredura de potencial de 10 mV s^{-1} .

A regularidade dos valores obtidos para o potencial médio (E_m), usando-se diferentes cátions no preparo do eletrólito, pode-se sugerir que os cátions estudados não interagem com o metal central da espécie eletroativa.

Ao contrário, a natureza do ânion tem grande influência sobre o comportamento eletroquímico do sensor tipo pasta de carbono com **STFc**. De acordo com os dados da Tabela 5, podemos verificar que o potencial médio

varia em função da natureza do ânion do eletrólito suporte.

Tabela 5. Efeito da natureza do ânion do eletrólito suporte sobre a resposta voltamétrica o sensor tipo pasta de carbono com **STFc**.

Ânion*	Em (mV)	ΔE_p (mV)	I _{pa} (μA)	I _{pc} (μA)
Perclorato	318	104	7,0	9,5
Cloreto	310	91	7,3	9,7
Nitrato	308	87	7,4	10
Fosfato	280	75	29	33
Acetato	280	72	22	26
PIPEs	272	67	34	36

*Todas as soluções foram preparadas com sais contendo sódio. A concentração das soluções foi 0,1 mol L⁻¹.

A velocidade de varredura de potencial foi de 10 mV s⁻¹.

O aumento de Em, observado na ordem perclorato > cloreto > nitrato > acetato = fosfato, mostra que alguma interação ocorre entre o ânion e o eletrodo.

Comportamento semelhante é mostrado por Taraszewska¹¹⁴, em estudos com complexos de níquel.

Neste trabalho, foi correlacionada a mudança do potencial médio com a capacidade do ânion se difundir dentro da pasta de carbono e a interação existente entre o ânion do eletrólito com a espécie eletroativa da pasta.

A justificativa pode ser feita levando-se em conta a capacidade de coordenação do ânion com o ferro da espécie eletroativa¹¹⁵.

V.7.3.EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO ELETRÓLITO

A concentração do eletrólito suporte também afeta significativamente o comportamento eletroquímico do sensor contendo **STFc**, imobilizado na sílica gel. Os dados obtidos podem ser visualizados na Figura 22.

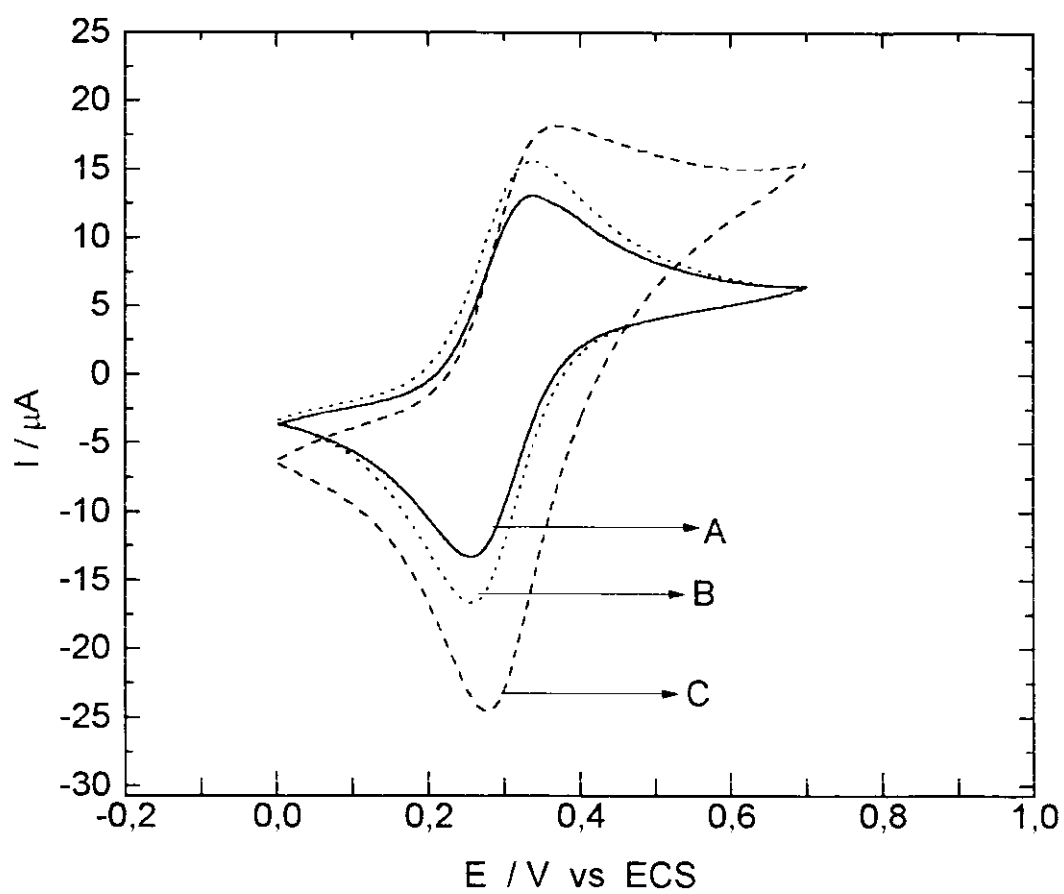


Figura 22. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes concentrações do eletrólito suporte fosfato de sódio. (A) 0,025, (B) 0,05, (C) 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹.

O aumento de corrente de pico verificado com o aumento da concentração do eletrólito pode ser atribuído ao aumento do agente de transporte de carga, promovendo uma compensação de carga no sistema.

Neste caso, a razão entre a carga anódica e catódica foi próxima de um. Sendo que a separação entre potenciais de pico não foi zero. O estudo da variação de velocidade de varredura do potencial, mostra que para velocidade de varredura (v) maior que 2mV s^{-1} , o gráfico da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) é linear, Figura 23.

Este comportamento é similar àqueles processos que são controlados por transporte de massa, apesar do complexo, neste caso, estar fortemente adsorvido no suporte. Atribui-se este comportamento ao transporte iônico que ocorre no eletrólito, ou através da interface do sensor para compensação de carga.

Pode-se ainda supor que alguma contribuição para tal comportamento é proveniente do mecanismo de transferência de elétrons no sistema. Semelhante, ao que ocorre em filmes poliméricos¹¹⁶, envolvendo o processo "jump", ou seja, a transferência eletrônica não é feita em fluxo contínuo mas na forma de saltos, que passam de uma molécula a outra de forma não seqüenciada.

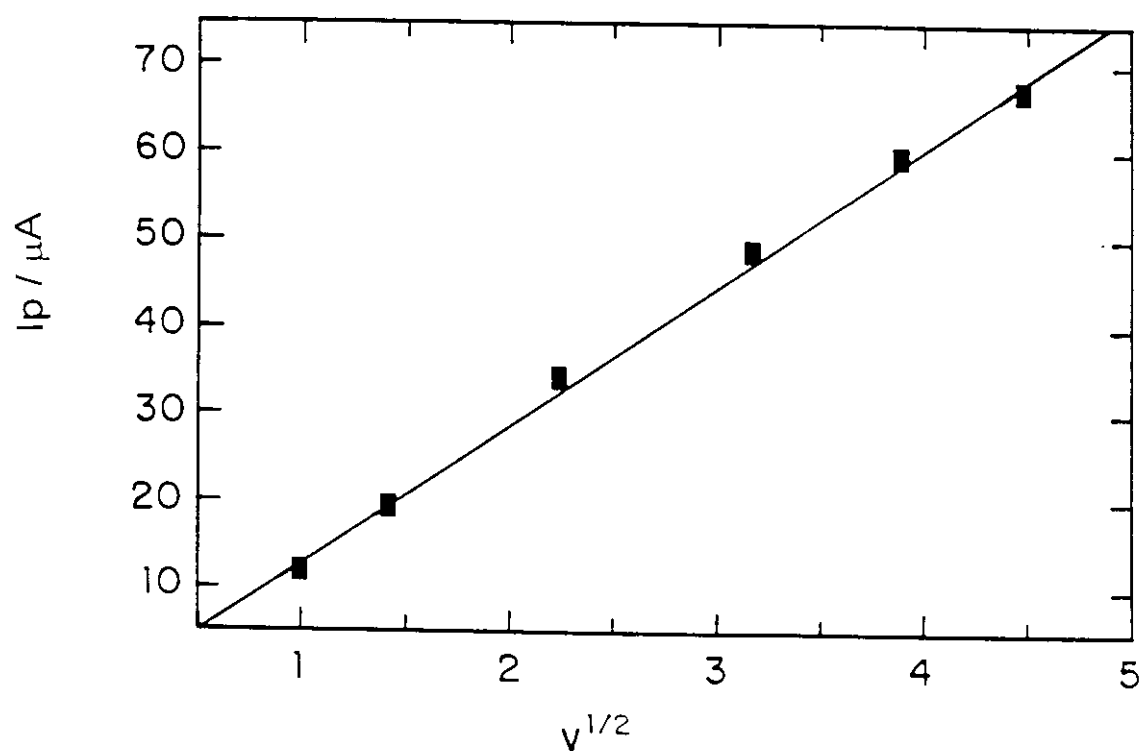


Figura 23. Variação da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial. Solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,8$ como eletrólito suporte.

V.7.4. ESTABILIDADE DO SENSOR

A estabilidade do sensor, e conseqüentemente da pasta contendo **STFc**, foi estudada por voltametria cíclica. Pelos valores de corrente de pico anódico e catódico da Tabela 6, pode-se afirmar que o sensor não sofre modificação de propriedades eletroquímicas pelo menos durante a varredura de potencial, durante mil ciclos consecutivos.

Tabela 6. Dependência da corrente de pico em função do número de ciclos voltamétricos.

* Número de ciclos	I _{pa} (μA)	I _{pc} (μA)
1	17,4	18,6
2	16,7	18,5
10	16,7	18,4
20	16,6	18,5
50	16,6	18,5
100	16,5	18,3
200	16,6	18,3
500	16,5	18,4
1000	16,4	18,2

*Eletrólito suporte: solução PIPES 0,1 mol L⁻¹, pH = 6,8.
Velocidade de varredura de potencial de 10 mV s⁻¹.

V.6.5. EFEITO DE pH

O efeito da concentração hidrogeniônica do meio, igualmente estudado por voltametria cíclica, usando-se o mesmo sensor nas diferentes condições de pH. A faixa de pH foi limitada entre 4,0 e 7,0, porque valores menores não foram de interesse, uma vez que a enzima glicose oxidase apresentou baixa atividade. Meio mais básico podem interferir no suporte sílica gel além de afetar a atividade da enzima.

Pela Tabela 6, pode-se verificar que o potencial médio aumenta para valores mais positivos à medida que o pH diminui. Os dados são concordantes com o comportamento observado para a maioria dos complexos de ferro¹¹⁷. A formação de um par iônico estável entre H^+ e o mediador é uma justificativa razoável para os dados uma vez que o próton H^+ possui uma constante de associação maior em relação a outros íons de metais alcalinos⁸⁰.

Tabela 6. Efeito do pH sobre o potencial médio

* pH do eletrólito	Em (mV)
4,5	367
5,1	341
6,8	288
7,5	283

*Eletrólito: solução PIPES 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura de potencial de 10 mV s⁻¹.

V.8. ATIVIDADE CATALÍTICA DO BIOSSENSOR

A atividade da enzima imobilizada, para oxidação de glicose foi verificada pela corrente catalítica apresentada na resposta voltamétrica obtida, quando o biossensor é colocado num meio contendo glicose, como pode ser visto pela Figura **24**.

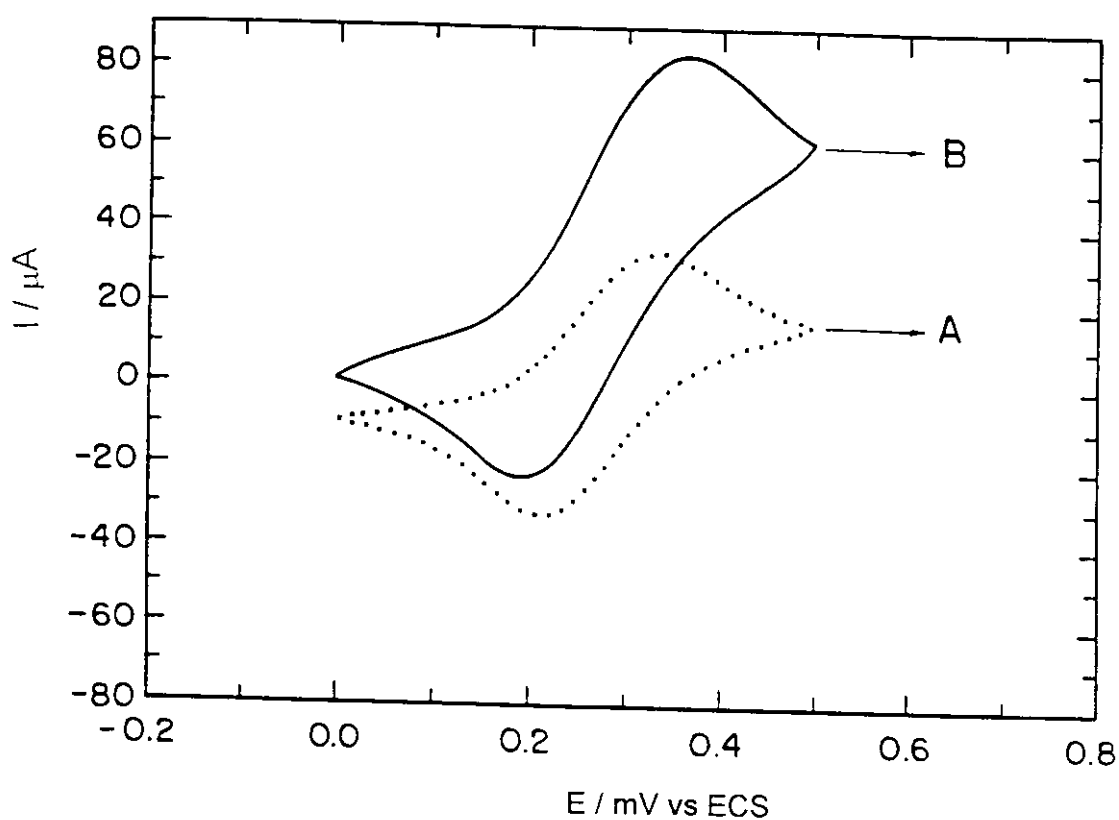


Figura 24. Voltamogramas cíclicos obtidos com o biossensor na ausência (**A**), e na presença (**B**) de solução de glicose $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrólito usado foi uma solução tampão PIPES $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,8$. Velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

A eletrocatalise do biossensor fica evidenciada, observando-se a variação da corrente catalítica (I_c) em função das diferentes velocidade de varredura de potencial, mostrado na Figura 25. A variação decrescente em função da velocidade de varredura de potencial mostra que o processo catalítico é lento. Uma possível razão, seria a dificuldade do substrato em se difundir através da pasta.

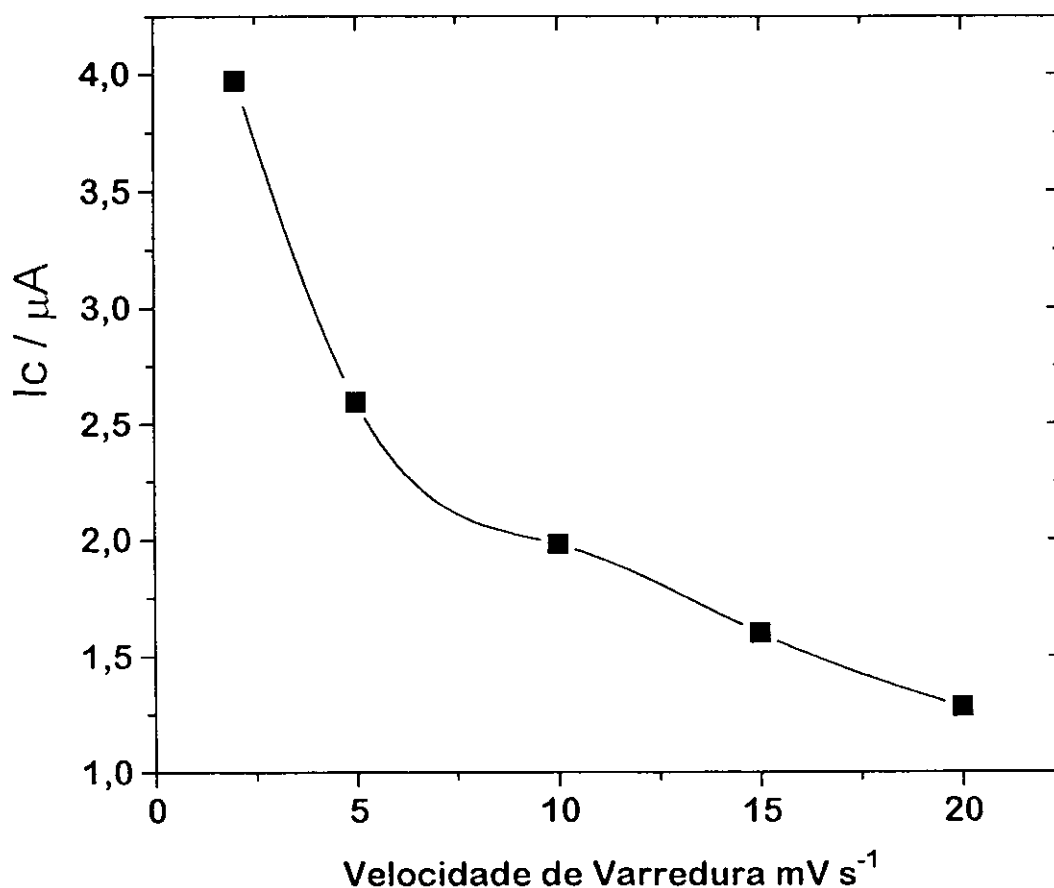


Figura 25. Variação da corrente catalítica em função da velocidade de varredura. Solução de glicose de $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Solução PIPES $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,8$.

V.8.1. TEMPO DE RESPOSTA DO BIOSSENSOR

Condidera-se tempo inicial como sendo aquele do instante da adição do substrato no meio e tempo final como aquele onde a corrente faradáica do sistema se estabiliza. Pela Figura **26**, pode-se avaliar que um tempo de 15 segundos foi suficiente para o sistema atingir o máximo de corrente. Por isso, o tempo de resposta foi cerca de quinze segundos, similar àqueles observados para biossensor de glicose reportado na literatura^{118,119}.

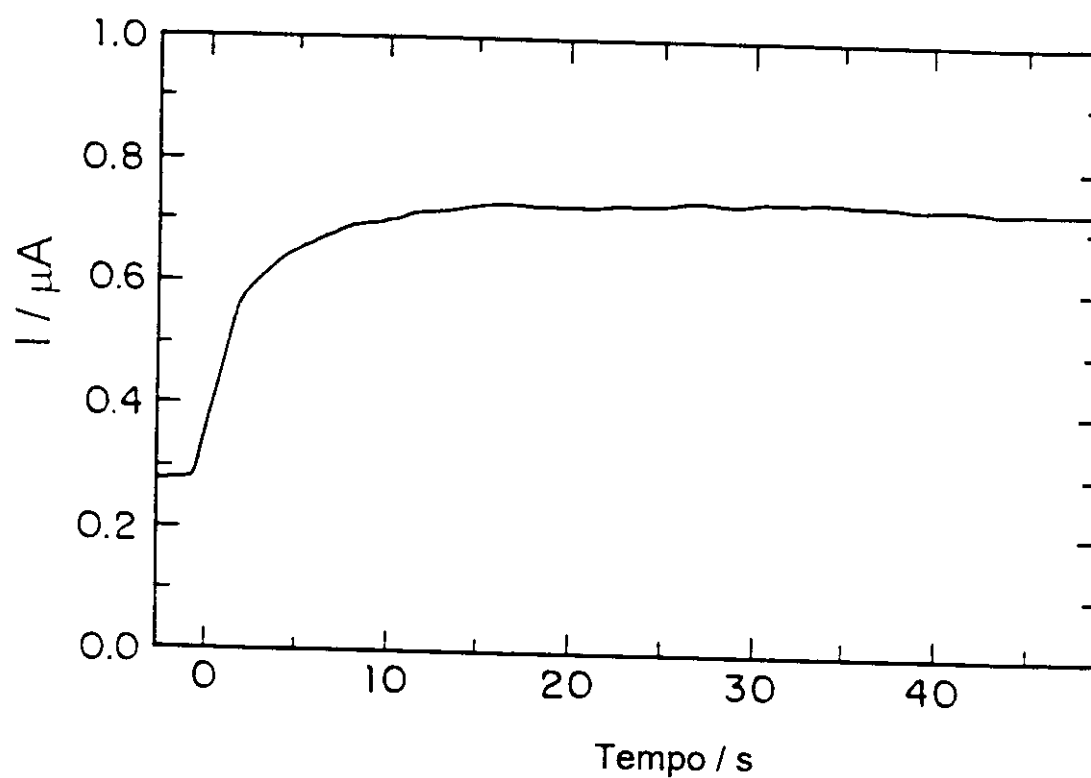


Figura 26. Tempo de resposta para o biossensor após adição de 50 μL de solução de glicose $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em 5,0 ml de solução tampão PIPES $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,8$.

V.8.2. LIMITAÇÃO DIFUSIONAL DO SISTEMA

As medidas feitas sob agitação constante, foram semelhantes àquelas onde o sistema se encontrava em equilíbrio dinâmico.

Este comportamento pode ser justificado via controles difusionais de espécie no sistema.

O gráfico de Eadie-Hofstee, Figura 27, obtido com o biossensor mostra uma curva convexa em relação à origem dos eixos cartesianos.

Desde o primeiro eletrodo de pasta de carbono modificado¹²⁰, tem sido feito estudos para o entendimento do comportamento do eletrodo pasta de carbono. Alguns trabalhos buscam a caracterização do processo catalítico de sistemas construídos com enzima imobilizada e mediador redox no eletrodo de pasta de carbono^{121,123}.

O gráfico da Figura 27, mostra uma curva característica de sistemas enzimáticos onde a quantidade de mediador incorporado na superfície do eletrodo é pequena⁸⁹. Entretanto, no sistema estudado a quantidade de mediador imobilizada é relativamente grande. Uma possível explicação para este comportamento envolve o mecanismo de transferência de elétrons do cofator da enzima para o mediador.

Uma alternativa da transferência de elétrons seria realizada por um "ponte" formada pelo cofator da enzima e o mediador na superfície da sílica, como anteriormente proposto⁹⁰. Desta forma, pequena quantidade de mediador

estaria suficientemente próximo da enzima para proporcionar a interação com a flavina da enzima e uma pequena quantidade do mediador poderá estar próximo da enzima para interagir com a flavina da enzima, o que pode ser justificado pela rigidez da matriz¹²³. Se por um lado a grande rigidez da matriz impede uma eficiente interação de todo o sistema, a alta densidade de empacotamento promove uma orientação particular da enzima e do mediador na superfície da sílica. Esta suposição permite uma interação favorecida entre a enzima e o mediador.

Outro ponto que deve ser considerado é a porosidade da sílica, onde pequenos poros podem ser bloqueados durante o procedimento de imobilização das espécies. O bloqueio causa uma diminuição da quantidade de mediador eletroquimicamente ativo do processo catalítico se comparada à quantidade quantificada. Isto leva a pensar que a glicose deve se difundir para dentro da pasta. Um comportamento similar aos estudos teóricos de processos com limitação difusional interna^{89,124,125}. Este fato deve explicar porque a agitação não afeta os valores de medidas de corrente. Como a difusão externa não afeta o processo, e a quantidade de mediador ativo na mediação eletrônica, aparentemente é pequena, justifica-se então o grande nível de corrente obtido com o biossensor se comparado com outros sistemas⁸⁹, pela alta área superficial da sílica que permite maior quantidade de enzima disponível para reação.

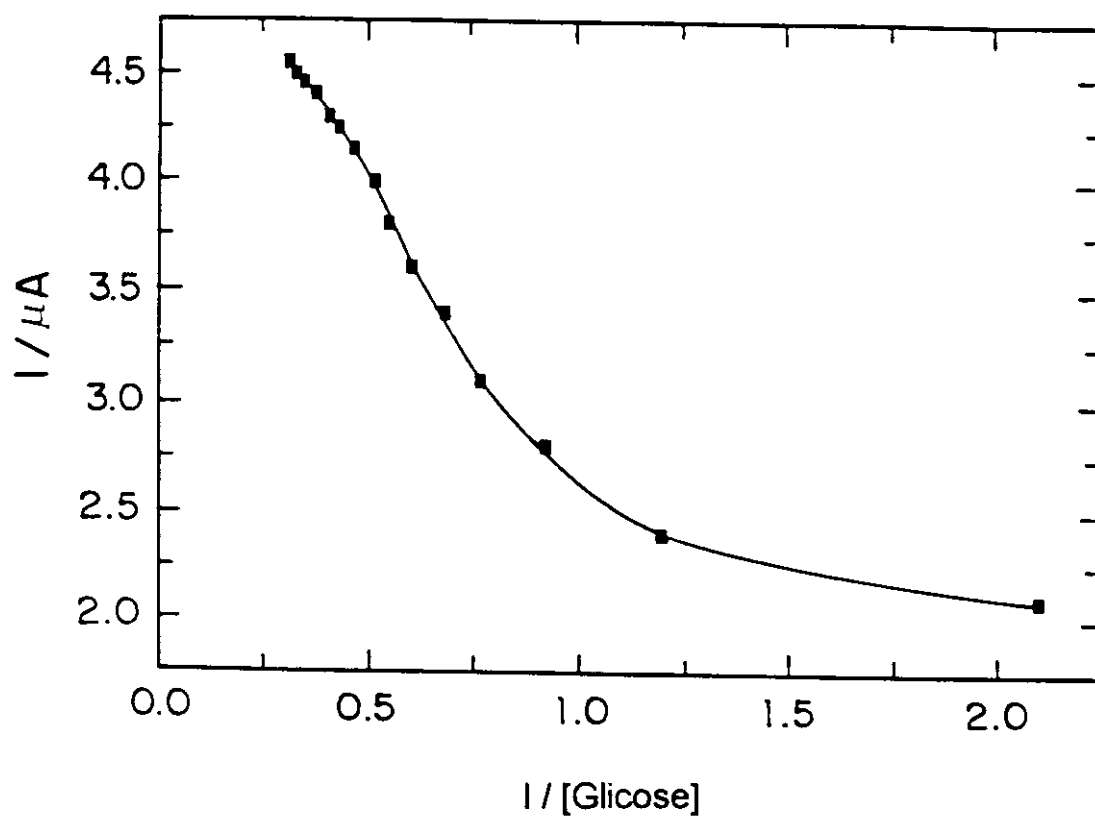


Figura 27. Gráfico Eadie-Hosfer obtido com diferentes concentrações de glicose. Potencial aplicado de 340 mV vs ECS. Tampão pipes $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,8

V.9. ESTABILIDADE DO MATERIAL

Um importante aspecto a ser considerado é o da estabilidade do biossensor bem como o de seus componentes.

A pasta pode ser armazenada por até seis meses, em geladeira, mantendo-se a mesma atividade. Isto é de fundamental importância pois permite uma maior semelhança entre biossensores construídos em dias diferentes.

V.10. CURVA PADRÃO PARA GLICOSE

Curva amperométrica típica é mostrada na Figura 28, obtida com adições sucessivas de alíquotas de 50 μL de solução de glicose $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, na célula eletroquímica contendo 5,0 ml de solução tampão PIPES $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,8$.

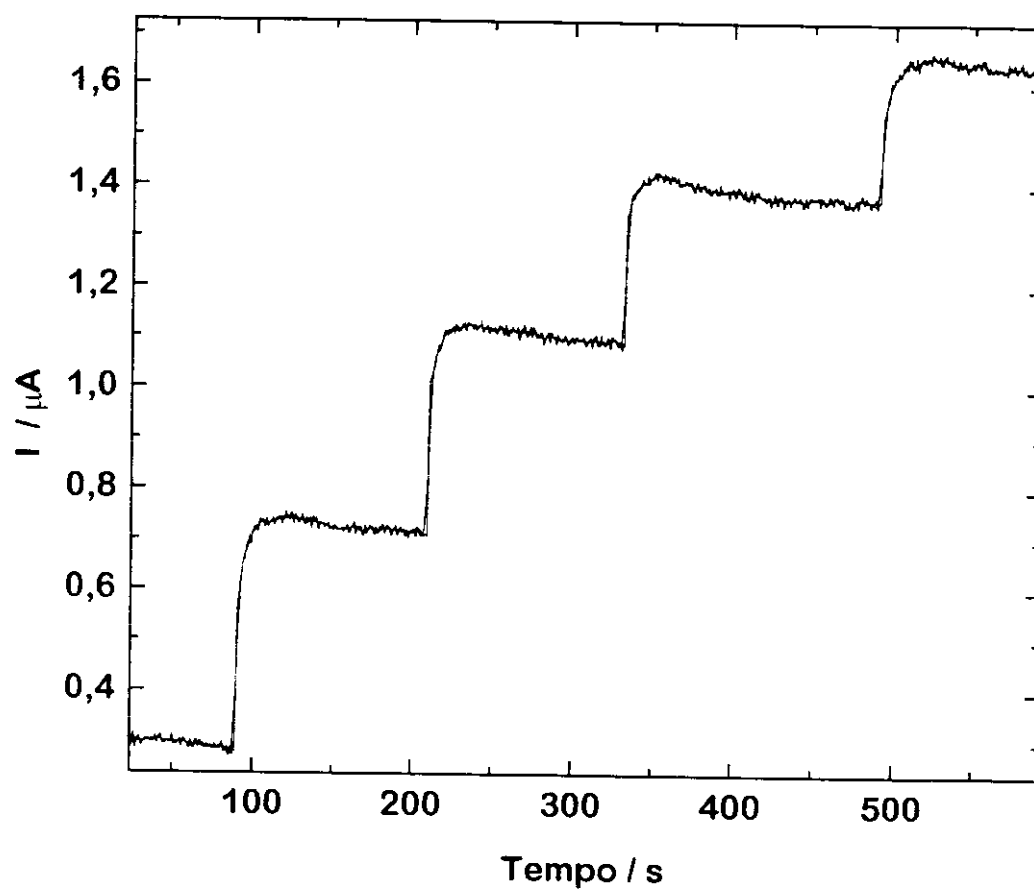


Figura 28. Curva amperométrica obtida com adições de 50 μL de solução de glicose $1.0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Potencial aplicado igual a 340 mV vs ECS.

Dados obtidos de experimentos amperométricos, feitos com diferentes concentrações de glicose, são mostrados no gráfico Figura 29. A curva possui uma faixa linear de resposta entre $1,0 \cdot 10^{-4}$ e $7,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, descrita pela equação de reta:

$$I = (- 0,012 \pm 0,004) + (0,608 \pm 0,009) [\text{glicose}] .$$

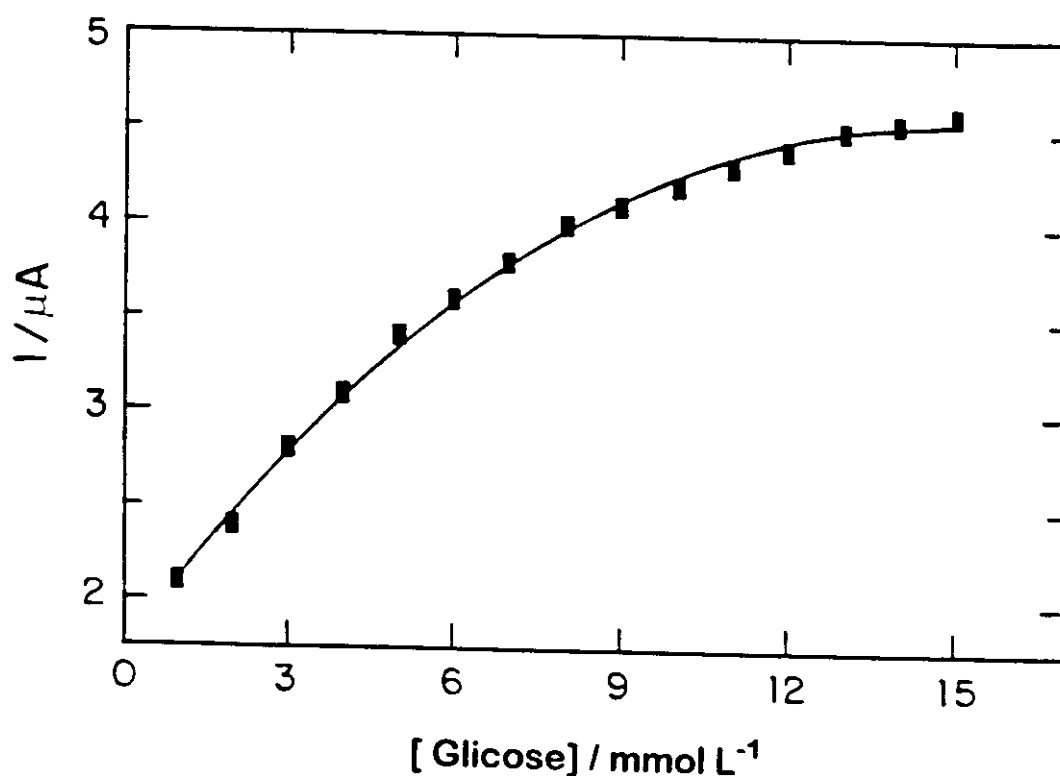


Figura 29. Curva de corrente em função da concentração de glicose, obtida com o biossensor. Solução PIPES $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,8 foi usada como eletrólito. Potencial aplicado de 340mV vs ECS.

Esta faixa foi usada para calibrar o biossensor para as análises. Acima desta faixa, a resposta não foi linear, indicando que a enzima pode estar saturada.

V.11. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SORO SANGÜINEO

A determinação de glicose em amostras de soro e amostras de padrão Merck, foram feitas em triplicata utilizando-se o biossensor e os resultados comparados com aqueles obtidos usando-se o "Kit" da Merck, que é uma metodologia enzimática com detecção colorimétrica.

Os dados são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Quantidade de glicose (mg/dL) encontrada usando-se o Kit da Merck e pelo biossensor.

AMOSTRA	*KIT MERCK	BIOSSENSOR
Padrão Merck	100	103 ± 4
Amostra de soro 1	87	84 ± 3
Amostra de soro 2	83	83 ± 2
Amostra de soro 3	120	119 ± 5
Amostra de soro 4	234	228 ± 8
Amostra de soro 5	187	191 ± 5

*Os resultados foram obtidos pelo laboratório do Hospital das Clínicas da Unicamp.

Como podem ser vistos por esta tabela, os métodos usados apresentam uma boa correlação de dados.

V.12. CONCLUSÕES

Pelos dados obtidos no decorrer do trabalho, conclui-se que a sílica gel pode ser empregada para construir novos eletrodos modificados tipo pasta de carbono.

O material mostra-se adequado para propostas catalíticas, devido às suas características tais como: grande área superficial, porosidade, resistência mecânica/química, versatilidade de mediadores eletrônicos que podem ser imobilizados na superfície. Estas características constituem vantagens que podem ser melhor avaliadas para o aprimoramento na construção de sensores.

Embora o mecanismo de transferência de elétrons não esteja completamente estabelecido, a estabilidade do mediador e da enzima e a alta sensibilidade do biossensor, neste caso, coloca a sílica gel modificada como um artifício promissor a ser usado na construção destes dispositivos para uso em análise.

A boa correlação entre a metodologia clássica de análise para glicose e o biossensor confirmam o grande potencial que pode ser explorado com este sistema.

A construção do biossensor é simples e não requer cuidados especiais de armazenamento, sendo apropriado

para uso em experiências didáticas. A estabilidade apresentada pelo material pode ser promissor para imobilizar outros mediadores de elétrons, principalmente quando estes não são muito estáveis em suas formas livres^{93,126}.

V.13. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos com os dois biossensores, permitem prever outras possibilidades de trabalho, não só com as enzimas estudadas, como também com outros sistemas enzimáticos. Assim poder-se-ia citar:

- Substituição do filme de glutaraldeído por outro filme eletropolimerizado.
- Imobilizar o mediador e a enzima num único filme eletropolimerizado.
- Utilização da sílica gel modificada para imobilização de salicilato hidroxilase e o mediador.
- Usar o sistema sílica gel modificado com TiO_2 para imobilizar diversos tipos de mediadores de interesse na construção de biossensores.
- Utilização de sistema FIA, com os dois tipos de sensores.

- Amplificação da resposta do biossensor envolvendo NADH, com utilização de outro sistema enzimático.
- Usar os biossensores para determinação de salicilato em matrizes biológicas, como soro sanguíneo e urina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Moses, P.R.; Wier, L. e Murray, W.; *Anal. Chem.*; **47**(12) [1975], 1882.
- [2] Heineman, W.R. e Kissinger, P.T.; *Anal. Chem.*; **50**(5), [1978], 166R.
- [3] Snell, K.D.; e Keen, A.G.; *Chem. Soc. Rev.*; **8**, [1979], 259.
- [4] Murray, R.W.; "Chemically Modified Electrodes In Electroanalytical Chemistry", Editor Bard, A.J. vol.13. Marcel Dekker Inc., N.Y., [1984], p.191-368.
- [5] Kuo, K.N. e Murray, R.W.; *J. Electroanal. Chem.*; **131**, [1982], 37.
- [6] Guadalupe, A.N. e Abruña, H.D.; *Anal. Chem.*; **57**, (1), [1985], 142.
- [7] Yon Hin, B.F.Y. e Lowe, C.R.; *Anal. Chem.*; **59**(17), [1987], 2111.
- [8] Paliteiro, C.; Hamnett, A. e Goodenough, J.B.; *J. Electroanal. Chem.*; **160**, [1984], 359.
- [9] Amos, L.J.; Duggal, A.; Mirsky, E.J.; Ragonesi, P.; Bocarsly, A.B. e Bocarsly, P.A.F.; *Anal. Chem.*; **60**(3) [1988], 254.
- [10] Peter, L.M.; Dürr, W.; Bimdra, P. e Gerischer, H.; *J. Electroanal. Chem.*; **71**, [1976], 31.
- [11] Ellis, D.; Eckhoff, M. e Neff, V.D.; *J. Phys. Chem.*; **85**, [1981], 1225.
- [12] Don, S. e Jin, Z.; *J. Electroanal. Chem.*; **256**, [1988], 193.

- [13] Jovanovic,V.M.; *Electroanalysis*; **7**(6),[1995],574.
- [14] Fouds,N.C. e Lowe,C.R.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*; **82**,[1986],1259.
- [15] Yon-Hin,B.F.Y.; Smolander,M.; Crompton,T. e Lowe,C.R.; *Anal. Chem.*; **65**,[1993],2067.
- [16] Wolowacz,S.E.; Yon Hin,B.F.Y. e Lowe,C.R.; *Anal. Chem.*; **64**(14),[1992].1541.
- [17] Bartlett,P.N. e Caruana,D.J.; *Analyst.*; **117**,[1992],1287-1292.
- [18] Marchesiello,M. e Geniès.E.M.; *Electrochim. Acta.*; **37**(11),[1992],1987.
- [19] Olson,C. e Adams,R.N.; *Anal. Chem.*; **22**,[1960],577.
- [20] Kalcher,K.; Kauffmann,J.M.; Wang,J.; Svancara,I.; Vystras,K.; Neuhold,C. e Yang.Z. *Electroanalysis*; **7**(1),[1995],5.
- [21] Gorton,L.; *Electroanalysis.*; **7**(1),[1995],23.
- [22] Ching,S.; Dudek,R.C.; Tabet,E.A.; Willis,W.S. e Suib,S.L.; *Langmuir*; **10**(6),[1994],1657.
- [23] Zaldivar,G.A.P.; Gushikem,Y. e Kubota,L.T.; *J. Electroanal. Chem.*; **318**,[1991],247.
- [24] Kotte,H.; Grüding,B.; Vorlop,K.D.; Strehlitz,B. e Stottmeister,U.; *Anal. Chem.*; **67**(1),[1995],65.
- [25] Kubota,L.T. e Gushikem,Y.; *J. Electroanal. Chem.*; **362**,[1993],219.
- [26] Oliveira Neto,G.de e Yamanaka,H.; *Química Nova.*; **11**(4),[1981],432.

- [27] Alvarez-Icaza, M. e Bilitewski, U. *Anal. Chem.*; **68** (11), [1993], 525A.
- [28] Dennilson, M.J. e Turner, A.P.F.; *Biotech. Adv.*; **13**, [1995], 1.
- [29] Zubay, G.; "*Biochemistry*". 2a.ed. Ed. Macmillan Publishing Company, New York, 1989.
- [30] Guilbault, G.G.; "*Analytical Uses of Immobilized Enzymes*". Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, 1984.
- [31] Serimgeour, K.G.; "*Chemistry and Control of Enzymes Reations*". Academic Press, Inc, Ltd. London. 1977.
- [32] Stryer, L.; "*Bioquímica*". Ed. Guanabara Koogan, 1992.
- [33] Scouten, W.H.; "*Solid Phase Biochemistry-Analytical and Synthetica Aspects*". John Wiley & Sons., [1983].
- [34] Pantano, P. e Kuhr, W.G.; *Electroanalysis*; **7**(5), [1995], 405.
- [35] Smith, M.D. e Olson, C.L.; *Anal. Chem.*; **46**(11), [1974], 1544.
- [36] Moussy, F.; Harrison, D.J.; O'Brien, D.W. e Rajotte, R.V.; *Anal. Chem.*; **65**(15), [1993], 2072.
- [37] Gilmartin, M.A.T. e Hart, J.P.; *Anal. Proc. Inc. Acd. Comm.*; **32**, [1995], 341.
- [38] Turner, A.P.F.; Karube, I. e Wilson, G.S.; "*Biosensors -Fundamentals and Aplications*". Ed. Oxford Science Publications, 1986.
- [39] Guilbault, G.G. "*Analytical Aplications of Enzymes*". American Chemical Society-Education Division, 1987.

- [40] Gleria, K.D. e Hill, H.A.O.; *Inorganic Chim. Acta.*; **198-200**, [1992], 863.
- [41] Emr, A.S. e Yacynych, A.M.; *Electroanalysis*; **7**(10), [1995], 913.
- [42] Scouten, W.H.; Luong, J.H.T. e Brown, R.S.; *Tibtech.*; **13**(5), [1995], 178.
- [43] Shirakawa, B.H.; *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*; [1977], 578.
- [44] Imisides, M.D.; John, R.; Riley, P.J. e Wallace, G.G.; *Electroanalysis*; **3**, [1992], 879.
- [45] Imisides, M.D.; Wallace, G.G. e Wilke, E.A.; *Trends Anal. Chem.*; **7**(4), [1988], 143.
- [46] Miller, L.I.; Zinger, B. e Zhou, Q.X.; *J. Am. Chem. Soc.*; **109**, [1987], 2267.
- [47] Lyons, M.E.G.; Lyons, C.H.; Fitzgerald, C. e Bannon, T.; *Analyst*; **118**, [1993], 361.
- [48] Gao, Z.; Bobacka, J.; Lewenstam, A. e Ivaska, A.; *Electrochim. Acta*; **39**(5), [1994], 755.
- [49] Iwakura, C.; Kajiya, Y. e Yoneyama, H.; *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*; [1988], 1019.
- [50] Bélanger, D. Nadreau, J. e Fortier, G.; *J. Electroanal. Chem.*; **274**, [1989], 143.
- [51] Stewart, M.J. e Watson, I.D.; *Ann. Clin. Biochem.*; **24**, [1987], 552.
- [52] Trinder, P.; *Biochem. J.*; **57**, [1954], 301.
- [53] Kang, E.S.; Todd, T.A. e Capaci, M.T.; *Clin. Chem.*; **29**, [1983] 1012.

- [54] Sigma Diagnostics-Procedure N° 530. P.O.Box. 14508. St. Louis, Mo 63178 U.S.A., [1984].
- [55] Furman, M.M.S. e Finberg, L.M.D.; *Pediatric Pharmacol. and Therapeutics.*; **70**(2), [1967], 287.
- [56] You, K.S. e Bitticofer, J.A.; *Clin. Chem.*; **30**(9), [1984], 1549.
- [57] Haynes, W.M. e Wagenknecht, J.H.; *Anal. Lett.*; **4**(8), [1971], 491.
- [58] James, H.; Carmack, C. e Freiser, H.; *Anal. Chem.*; **44**, [1972] 856.
- [59] Choi, K.K. e Fung, K.W.; *Anal. Chim. Acta*; **138**, [1982] 385.
- [60] Papaglou, A.M.; Diamandis, E.P. e Hadjiioannou, T.P.; *Anal. Chim. Acta*; **159**[1984], 393.
- [61] Chan, W.H.; Wong, M.S. e Yip, C.W.; *J. Chem. Educ.*; **63**(10), [1986], 915.
- [62] Pereira, R.C.; Aleixo, L.M.; Godinho, O.E.S. Oliveira Neto, G.; *Química Nova*; **13**(3), [1990], 202.
- [63] Lima, J.L.F.C.; Montenegro, C.B.M. e Silva, A.M.R.; *J. Flow Injection Anal.*; **7**(1), [1990], 19.
- [64] Buskin, J.N.; Upton, R.A. e Willians, R.L.; *Clin. Chem.*; **28**, [1982], 1200.
- [65] Hoffman, A.J. e Mitchell, H.I.; *J. Pharm. Sci.*; **52**, [1963], 305.
- [66] Graham, G. e Rowland, M.; *J. Pharm. Sci.*; **61**(8), [1972], 1219.
- [67] Pulgarín, J.A.M. e Molina, A.A.; *Analyst.*; **119**, [1994] 1915.

- [68] Villari,A.; Micali,N.; Fresta,M. e Puglisi.; *Analyst*; **119**, [1994],1561.
- [69] Rivas,G.A. e Calatayud,J.M.; *Talanta*; **42**, [1995], 1285.
- [70] You,K.S.; *Clin. Chem.*; **149**, [1985],281.
- [71] Chubb,S.A.P.; Campbell,R.S.; Ramsay,J.R.; Hammond,P.M.; Atkison,T. e Price,C.P.; *Clin. Chim. Acta*; **155**, [1986],209.
- [72] Frew,J.E.; Bayliff,S.W.; Gibbs,P.N.B. e Green,M.J.; *Anal. Chim. Acta*; **224**, [1989],39.
- [73] Neumayr,M.; Friedrich,O. e Sontag,G.; *Anal. Chim. Acta*; **273**, [1993],469.
- [74] Neumayr,M.; Sontag,G. e Pittner,F.; *Anal. Chim. Acta*; **305**, [1995],26.
- [75] Rahni,M.A.N.; Guilbault,G.G. e Oliveira Neto,G.; *Anal. Chim. Acta*; **181**, [1986],219.
- [76] Bertocchi,P.B.; D'Ottavio,D.; Evangelist,M.E.; Mascini,M. e Palleschi,G.; *Clin. Chim. Acta*; **207**, [1992],205.
- [77] Fonog.T. e Rechnitz,G.A.; *Anal. Clin. Acta*; **158**(2) [1984],357.
- [78] Moore,T.J.; Joseph,M.J.; Allen,B.W. e Coury Jr,L.A. *Anal.Chem.*; **67**(11), [1995],1896.
- [79] Schlenoff,J.B. e Xu,H.; *J. Electroanal. Soc.*; **139**(9) [1992],2397.
- [80] Kubota,L.T.; *Tese de Doutorado*; Unicamp Campinas, São Paulo, [1993].

- [81] Zagórska, M.; Wycislik, H. e Przyluski, J; *Synthetic Metals*; **20**, [1987], 259.
- [82] Grault, J.T.; Anderson, J.M.; MacInnes, I.; Schröder, M.; Ternnant, G. e Girault, H.H.; *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*; [1987], 1095.
- [83] Lian, G. e Dong, S.; *J. Electroanal. Chem.*; **260**, [1989], 127.
- [84] Genies, E.M.; Bidan, G. e Diaz, A.F.; *J. Electroanal Chem.*; **149**, [1983], 101.
- [85] Gorton, L.; Csöregi, E.; Dominguez, E.; Pettersson, G. J.; Varga, G.M. e Persson, B.; *Anal. Chim. Acta*; **250**, [1991], 203.
- [86] Nowall, W. e Kuhr, W.G.; *Anal. Chem.*; **67**(19), [1995], 3583.
- [87] Gorton, L.; Bremle, G.; Csöregi, E.; Pettersson, G.J. e Persson, B.; *Anal. Chim. Acta*; **249**, [1991], 43.
- [88] Wang, J.; W.L.H.; Lu, Z.; Li, R. e Sanchez, J.; *Anal. Lett.*; **26**, [1993], 251.
- [89] Amine, A.; Kauffmann, J.M. e Guilbault, G.G.; *Anal. Lett.*; **26**(7), [1993], 1281.
- [90] Gorton, L.; Karan, H.I.; Hale, P.D.; Inagaki, T.; Okamoto, Y. e Skotheim, T.A.; *Anal. Chim. Acta*; **228**, [1990], 23.
- [91] Murthy, A.S.N. e Gupita, A.R.L.; *Anal. Chim. Acta*; **289**, [1994], 43.
- [92] Chi, Q. e Dong, S.; *Analyst.*; **119**(5), [1994], 1063.
- [93] Kubota, L.T.; Gouveia, F.; Milagres, B.G. e Oliveira Neto, G. de; *Electrochim. Acta*, in press.

- [94] Kullys, J.; Gleixner, G.; Shubmann, W. e Schmidt, H.L.; *Electroanalysis*; **5**, [1993], 201.
- [95] Chi, Q. e Dong, S.; *Electroanalysis*; **7**(2), [1995], 147.
- [96] Thomas, L.C.; e Christian, G.D.; *Anal. Chim. Acta*; **82**, [1976], 265.
- [97] Wring, S.A. e Hart, J.P.; *Analyst*; **117**, [1992], 1215.
- [98] Cai, C.X.; Ju, H.X. e Chen, H.Y.; *Anal. Chim. Acta*; **310**, [1995], 145.
- [99] Dong, S. e Ding, J.; *Synthetic Metals*; **24**, [1988], 273.
- [100] Reach, G. e Wilson, G.S.; *Anal. Chem.*; **64**(6), [1992], 381A.
- [101] Gilmartin, M.A.T. e Hart, J.P.; *Analyst*; **120**, [1995] 1029.
- [102] Kubota, L.T.; Gushikem, Y. Perez, J. e Tanaka, A.A.; *Langmuir*; **11**, [1995], 1009.
- [103] Mizutani, F.; Yabuki, S.; Okuda, A. e Katsura, T.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*; **64**, [1991], 2849.
- [104] Hu, J. e Turner, A.P.F.; *Anal. Lett.*; **24**(1), [1991], 15.
- [105] Mannino, S e Cosio, M.S.; *Analyst*; **119**(9), [1994], 2001.
- [106] Treloar, P.H.; Christie, I.M.; Kane, J.W.; Crump, P.; Nkohkwo, A.T. e Vadgama, P.M.; *Electroanalysis*; **7**(5), [1995], 216.
- [107] Kotte, H.; Grüding, B.; Vorlop, K.D.; Strehlitz, B. e Stottmeister, U.; *Anal. Chem.*; **67**(1), [1995], 65.

- [108] Cass,A.E.G.; Davis,G; Francis,G.D.; Hill,A.O.; Aston,W.J.; Higgs,I.J.; Plotkin,E.V.; Scott,L.D. L.e Turner,A.P.F.; *Anal. Chem.*; **56**, [1984],667.
- [109] Turner,A.P.F.; Aston,W.J. e Higgins,I.J.; *Anal. Chim. Acta*; **163**, [1984],161.
- [110] Beh,S.K.; Moody,G.J. e Thomas,J.D.R.; *Analyst*; **116**(5), [1991],459.
- [111] Hendry,S.P.; Cardosi,M.F. e Turner,A.P.F.; *Anal. Chim. Acta*; **281**, [1993],453.
- [112] Dicks,J.M.; Hattori,S.; Karube,I.; Turner,A.P.F. e Yokozawa,T.; *Ann.Biol.Clin.*; **47**, [1989],607.
- [113] Kubota,L.T. e Gushikem,Y.; *Electrochim. Acta*; **37**, [1992], 2477.
- [114] Taraszewska,J. e Roslonek,G.; *J. Eletroanal. Chem.* **371**, [1992],223.
- [115] Lever,A.B.P.; *Inorg. Chem.* **29**, [1990],1271.
- [116] Shinguehara,K.; Oyama,N. e Anson,F.C.; *J. Am. Chem. Soc.*; **103**, [1981],2552.
- [117] Zagal,J.H.; Pães,M.; Santos Jr,J.R.; Tanaka,A.A. e Linkous,C,A.; *J. Electroanal. Chem.*; **339**, [1992], 13.
- [118] Ivakura,C.; Kajiya,Y. e Yoneyama,H.; *J. Chem. Soc. Chem Comm.*; [1988] 1019.
- [119] Shaolin,M.; Huaiguo,X. e Bidong,Q. *J. Electroanal. Chem.*; **304**, [1991],7.
- [120] Kuwana,T. e French,W.G.; *Anal.Chem.* **36**, [1964],241.
- [121] Amine,A.; Kauffmann,J.M.; Patriache,G.J. e Kaifer, A.E.; *Anal. Lett.*; **24**(8), [1991],1293.

- [122] Kulys, J.; Schuhmann, W. e Shmidt, H.L.; *Anal.lett.*; **25**(6), [1992], 1011.
- [123] Hale, P.D.; Inagaki, T.; Lee, H.S.; Karan, H.I.; Okamoto, Y. e Skothein, T.A.; *Anal. Chim. Acta*; **228**, [1990], 31.
- [124] Engasser, J.M. e Hovarth, G.; "*Immobilized Enzyme Principles*". Ed. Wingrad, L.B.; Katzir E.K. e Goldtein, L.; Academic Press, New York, [1976] p. 127
- [125] Engasser, J.M. e Hovarth, G.; *J. Theor. Biol.*; **42**, [1973], 137.
- [126] Yabuki, S.; Shinohara, H.; Ikariama, Y. e Aizawa, M.; *J. Electroanal. Chem.*, **277**, [1990], 179.

Apêndice 1.

1. Benzilviologeno
2. Pirrolferroceno
3. 3-(3,6 Dioxahéptiltiofeno)
4. 6(pirrol-1)hexil9,10antraquinona-2sulfonato
5. 3-(6-ferrocenil-6 hidroxifenil)pirrol
6. N Vinilcarbazol
7. Difenilamina
8. Poli(aminosacarídeo), [2-amino-2-dioxi-(1→4)-β-D glicopirano; poli(1,4-β-D glicopiranosamina] polianilina
9. Dítieno[3,4-b13',4'-d] tiofeno
10. N-(3(trimetoxissilil))propil pirrol
11. Poliaquíltiofeno
12. Poli(3-(tiofeno-δ butano sulfonato)de sódio
13. Polialquílpirrol
14. Isotianofiteno
15. 1 metil-1-(3 pirrol-1 propil)-4,4' biperidínio tetrafenilborato
16. Benzotiofeno

C U R R I C U L U M V I T A E

DADOS PESSOAIS

Nome: BENJAMIN GONÇALVES MILAGRES

Data de nascimento : 07/11/1951

Filiação - Pai : Evaristo Gonçalves da Silva

Mãe : Maria José das Mercês

Naturalidade : São Miguel do Anta - MG.

Profissão : Químico

RG : M 201 283

CIC : 197 431 656/49

Endereço Residencial : Rua Ervália, 162

Bairro : João Braz da Costa Val

Viçosa - MG.

36570 000

Endereço Profissional : Depto. de Química da U.F.V.

Centro de Ciências Exatas

Universidade F. de Viçosa

Viçosa - MG.

36570 000

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Grau do Curso : Ginásial

Instituição : Colégio de Viçosa - Viçosa - MG.

Período : março/65 a dezembro de 1969.

Grau do Curso : Colegial

Instituição : Colégio de Viçosa / U.F.V - Viçosa - MG.

Período : março/70 a dezembro de 1972.

Grau do Curso : Licenciatura em Química

Instituição : U.F.V. - Viçosa - MG.

Período : março/74 a junho de 1977.

Grau do Curso : Pós-Graduação

Especialização: Mestrado em Química Analítica

Instituição : UNICAMP - Campinas - SP.

Período : março/82 a dezembro de 1984

Grau do Curso : Pós Graduação

Especialização: Doutorado em Química

Instituição : UNICAMP - Campinas - SP.

Período : Agosto/91 a Março de 1996

TRABALHOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO
DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO.

- 1- Lauro T. Kubota, Benjamin G. Milagres, Efraim L. Reis, e Graciliano de Oliveira Neto.; *A New Amperometric Detector For Flow Injection Analysis*. J. Flow Injection Anal. 12(2), [1995], 223.
- 2- Milagres, B.G.; Kubota, L.T e Oliveira Neto, G.; *Immobilized Ferrocene and Glucose Oxidase On Titanium(IV) Oxide Grafted Onto a Silica Gel Surface and its Application as an Amperometric Glucose Sensor*. Electroanalysis., aceito para publicação in press.
- 3- Kubota, L.T.; Gouveia, F.; Andrade, A.N.; Milagres, B.G. e Oliveira Neto, G.; *Electrochemical Sensor For NADH Based on Meldola'S Blue Immobilized on Silica Gel Modified With Titanium Phosphate*. Electrochim. Acta. aceito para publicação in press.
- 4- Kubota, L.T.; Milagres, B.G.; Gouveia, F. e Oliveira Neto, G.; *A Modified Carbon Paste Electrode With Silica Gel Coated With Meldola'S Blue and Salicylate Hidroxilase as a Biosensor for Salicylate*. Anal. Lett. aceito para publicação in press.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS DURANTE O PERÍODO
DE DOUTORAMENTO

- 1- Milagres, B.G.; Kubota, L.T. e Oliveira Neto, G.; *Comportamento eletroquímico do ferroceno imobilizado sobre Óxido de Titânio(IV) Enxertado sobre a Superfície de Sílica Gel.* XI Congresso Iberoamericano de Eletroquímica / IX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. Águas de Lindóia - SP. 1994.
- 2- Milagres, B.G.; Kubota, L.T.; Reis, E.L. e Oliveira Neto, G.; *Um Novo Mini-sistema de Detecção Amperométrica para Análise de Injeção em Fluxo.* 8º Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química. Belo Horizonte - MG. 1994.
- 3- Oliveira Neto, G.; Mattos, I.L.; Milagres, B.G.; Zagatto, E.A.G.; *Determinação Amperométrica de Glicose e Sacarose em Caldo de Cana-de-Açúcar Empregando Sistemas de Análise por Injeção em Fluxos e Enzimas Imobilizadas.* 18a. Reunião Brasileira de Química / 7º Encontro Brasileiro de Fotoquímica e Fotobiologia. Caxambú - MG. 1995.

- 4- Kubota,L.T.; Gouveia,F.; Milagres,B.G. e Oliveira Neto,G.; *Desenvolvimento de um Sensor Amperométrico para NADH a Base de Eletrodo de Sílica Gel Quimicamente Modificada*. 18a. Reunião Brasileira de Química / 7º Encontro Brasileiro de Fotoquímica e Fotobiologia. Caxambú - MG. 1995.
- 5- Milagres,B.G.; Aleixo,L.M.; Oliveira Neto,G. e Kubota,L.T.; *Desenvolvimento de um Biossensor para Salicilato*. 18a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química / 7º Encontro Brasileiro de Fotoquímica e Fotobiologia. Caxambú - MG. 1995.
- 6- Milagres,B.G.; Gouveia,F.; Oliveira Neto,G. e Kubota,L.T.; *Sílica Gel Modificada: Um biossensor para Salicilato*. VIII Encontro Nacional de Química Analítica. Belo Horizonte - MG. 1995.
- 7- Gouveia,F.; Milagres,B.G.; Oliveira Neto,G. e Kubota,L.T.; *Desenvolvimento de um Sistema Amperométrico de Catecol em Fluxo*. Trabalho aceito para o XII Congresso Iberoamericano de Electroquímica / IX Encuentro Venezolano de Electroquímica a ser realizado em Março. Merida - Venezuela. 1996.

TRABALHOS PUBLICADOS

- 1- Milagres,B.G.; Barcellos,E.S.; Reis,E.L.; Boaventura, M. A.D. e Braathen,P.C.; *Práticas Fundamentais De Química Geral*. Ed. Imprensa Universitária - U.F.V. (1984).
- 2- Braathen,P.C.; Milagres,B.G. e Barcellos,E.S.; *Variação da Concentração de Oxigênio Dissolvido em Tanques da Estação de Hidrobiologia e Psicultura de Viçosa*. Rev. Ceres 30(169),[1983],179.
- 3- Milagres,B.G. e Martins,J.W.; *Reextração Líquido-Líquido Convencional de Fe,Co,Ni,Cu e Pb do Extrato Orgânico de uma Extração por Fase Única*. Tese de Mestrado. UNICAMP - Campinas - SP. (1990).