



**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Analítica**

**Determinação Enzimática de Salicilato com
Sistema de Análise por Injeção em Fluxo**

Tese de Doutorado

**Autora: Marta Maria Duarte Carvalho Vila
Orientador: Prof. Dr. Matthieu Tubino
Co-orientador: Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto**

UNIDADE IO
Nº CHAMADA 1/UNICAMP
V71d
V EX
TOMBO BCI 50636
PROC 16-837/02
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA 28/08/02
Nº CPD OK Ventura

CM00172540-6

BIB ID 255823

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

V71d

Vila, Marta Maria Duarte Carvalho

Determinação enzimática de salicilato com sistema de análise por injeção em fluxo / Marta Maria Duarte Carvalho Vila. -- Campinas, SP: [s.n], 2002.

Orientador: Matthieu Tubino.

Co-orientador: Graciliano de Oliveira Neto.

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

1. Salicilato. 2. Análise por injeção em fluxo.
3. Salicilato hidroxilase. 4. Espectrofotometria.
- I. Tubino, Matthieu. II. Oliveira Neto, Graciliano de. IV. Universidade Estadual de Campinas.
- III. Título.

Agradecimentos

- * Ao Prof. Dr. Matthieu Tubino, pela dedicada orientação, paciência e estímulo; minha gratidão e reconhecimento.*
- * Ao Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto pela valiosa orientação.*
- * À Prof^a. Dra. Neusi F. Hoehr pelas amostras de soro fornecidas.*
- * Aos amigos e companheiros de laboratório pela agradável convivência e cooperação.*
- * Aos funcionários do Instituto de Química pelo auxílio prestado.*
- * Ao CNPq e a FAPESP pelo auxílio financeiro.*
- * À minha família, presença constante em minha vida.*
- * E a todos que de uma forma ou de outra tornaram possível a conclusão deste trabalho.*

Resumo

Determinação enzimática de salicilato com sistema de análise por injeção em fluxo

Autora: Marta Maria Duarte Carvalho Vila

Orientador: Prof. Dr. Matthieu Tubino

Co-orientador: Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto

Palavras-chave: salicilato, análise por injeção em fluxo, salicilato hidroxilase, espectrofotometria.

A detecção rápida e segura dos níveis de salicilato em sangue é muito importante no acompanhamento clínico. O ácido salicílico é o maior metabólito do ácido acetilsalicílico no organismo, sendo o ácido acetilsalicílico um medicamento, freqüentemente, usado em diversos tratamentos médicos.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de sistemas de injeção em fluxo para a determinação quantitativa de salicilato em soro sanguíneo. Os métodos desenvolvidos se basearam na detecção de CO_2 e de catecol gerados na reação da enzima salicilato hidroxilase com o substrato salicilato. A enzima foi imobilizada em pérolas de vidro de porosidade controlada e o reator preparado foi integrado nos sistemas de fluxo.

O sistema desenvolvido com detecção do catecol foi baseado na reação entre o catecol e o 4-aminofenol com formação de uma espécie colorida, monitorada espectrofotometricamente a 565 nm. A faixa linear obtida foi de $0,5 \times 10^{-3}$ a $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com um limite de detecção de $0,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O método também foi empregado na determinação de ácido acetilsalicílico em medicamentos.

O outro método foi baseado na detecção do CO_2 . O CO_2 gerado na reação permeia através de uma membrana de silicóna, sendo recebido por um fluxo de uma solução de púrpura de bromocresol. A variação da absorbância da solução foi determinada espectrofotometricamente em 580 nm. Nas amostras de soro analisadas, na mesma faixa de concentração acima, obteve-se limite de detecção de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os métodos apresentaram concordância como o método de referência somando-se as vantagens ligadas ao sistema FIA.

Abstract

Enzymatic determination of salicylate by flow injection analysis

Author: Marta Maria Duarte Carvalho Vila

Adviser: Prof. Matthieu Tubino, PhD

Co-adviser: Prof. Graciliano de Oliveira Neto, PhD

Keywords: salicylate, flow injection analysis, salicylate hydroxylase, spectrophotometric.

The rapid and reliable detection of salicylate level in blood is very important in clinical monitoring. Salicylic acid is the main acetylsalicylic acid metabolic in the body. The acetylsalicylic acid is a medicine, commonly, used in various therapeutic chemicals.

The aim of this work was the development of a flow injection system for spectrophotometric quantitative determination of salicylate in human serum. These methods are based on the generation of CO₂ and catechol by the reaction of salicylate with the enzyme salicylate hydroxylase. This enzyme was chemically immobilized on controlled pore glass and the reactor prepared was integrated in the flow systems.

The method developed using determination of catechol was based on the reaction between catechol and 4-aminophenol to give a colored product monitored spectrophotometrically at 565 nm. The linear range was 0.5×10^{-3} a 5.0×10^{-3} mol L⁻¹ and the limit of detection was 0.2×10^{-5} mol L⁻¹. The method was used for determination of acid salicylic in medicines.

The other method was based on the detection of CO₂. The CO₂ generated in the reaction permeates through a silicone membrane and is received by a stream of bromocresol purple. The variation of solution absorbance was followed spectrophotometrically at 580 nm. The serum samples was analyzed in the same concentration. The detection limit was 1.0×10^{-4} mol L⁻¹. These methods were concordant with the reference method and added the advantages in flow systems.

Curriculum Vitae

1- Formação

1.1. Doutorado em Química Analítica

Instituto de Química - UNICAMP/ Campinas, SP (1997-2002).

1.2. Mestrado em Tecnologia de Alimentos

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP/ Campinas, SP (1993 –1996).

1.3. Graduação em Farmácia e Bioquímica

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP/ Ribeirão Preto, SP (1981 –1984).

2- Participação em Reuniões Científicas

2.1.VILA, M. M. D. C., TUBINO, M.; OLIVEIRA, G. N. Determinação de Salicilato Através de Sistema Enzimático de Injeção em Fluxo. XXI SBQ, Poços de Caldas/SP, 1998.

2.2.VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M.; RUSIG, O. Avaliação de Condições Reacionais para a Produção de Complexos entre Alguns Aminoácidos e Íons Férricos. Simpósio "100 Anos de Ensino Farmacêutico no Estado de São Paulo". USP, São Paulo/SP,1998.

2.3.VILA, M. M. D. C.; MAGNA, A.; TUBINO, M.; OLIVEIRA, G. N. Comparação entre Duas Técnicas de Imobilização Enzimática para Determinação de Salicilato em Fluxo. XXXVIII Congresso Brasileiro de Química, São Luís/Ma,1998.

2.4.VILA, M. M. D. C.; RUSIG, O.;TUBINO, M. Produção de Complexos de Ferro a Partir de Hidrolisado Protéico. I Workshop Científico dos Pós-Graduandos da UNICAMP, Campinas/SP,1998.

2.5.VILA, M. M. D. C.; RUSIG, O.; TUBINO, M. Avaliação da Biodisponibilidade de Ferro em Complexos Orgânicos Através de Ensaio "In Vivo". I Workshop Científico dos Pós-Graduandos da UNICAMP, Campinas/SP,1998.

2.6.VILA, M. M. D. C.; RUSIG, O.; TUBINO, M. Caracterização Química de Complexos de Ferro Obtido de Hidrolisado Protéico. I Workshop Científico dos Pós-Graduandos da UNICAMP, Campinas/SP,1998.

2.7.VILA, M. M. D. C.; RUSIG, O.; TUBINO, M. Preparation of Iron III Aminocarboxilatos. Chemical Characterization and Evaluation of Iron Bioavailability. 2nd Congress of Pharmaceutical Sciences, USP, Ribeirão Preto/SP, 1999.

2.8.VILA, M. M. D. C.; RUSIG, O.; TUBINO, M. Produção de Complexos de Ferro. Caracterização Química e Biológica. XXXIX Congresso Brasileiro de Química, Goiânia/GO, 1999.

2.9.VILA, M. M. D. C; TUBINO, M; OLIVEIRA, G. N. Dosagem de Salicilato Através de Análise Enzimática Espectrofotométrica em Sistema de Injeção em Fluxo. XXII SBQ. Poços de Caldas/SP, 1999.

2.10.VILA, M. M. D. C., TUBINO, M.; OLIVEIRA, G. N. Avaliação da Eficiência e Tempo de Vida de um Reator enzimático Obtido para Análise de Salicilato em Sistema de Injeção em Fluxo. 10° ENQA, Santa Maria/RS, 1999.

2.11.VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M., OLIVEIRA, G. N. Determinação de Salicilato em Soro por Análise Espectrofotométrica e Sistema FIA. XXIII SBQ, Poços de Caldas/SP, 2000.

2.12.VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M. Síntese e Caracterização Química de Aminocarboxilatos de Ferro XL Congresso Brasileiro de Química, Recife/PE, 2000.

2.13.VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M., OLIVEIRA, G. N. Análise de Salicilatos em Medicamentos Através de Reação Enzimática e Sistema de Injeção em Fluxo. XXIV SBQ, Poços de Caldas/SP, 2001.

2.14. MATIAS, F. A. A.; VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M. Método Simples para a Determinação Quantitativa "Spot-test" de Ácido Acetil-salicílico por Reflectância. 11° ENQA, Campinas/SP, 2001.

2.15. RODRIGUES, A.; VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M. Análise de Ácido Acetilsalicílico em Medicamentos Através de Sistema FIA e Membrana de Difusão Gasosa. XXV SBQ, Poços de Caldas/SP, 2002.

3 - Publicações em Revistas

3.1. VILA, M. M. D. C.; RUSIG, O.; TUBINO, M. Preparação de Aminocarboxilatos de Ferro III a Partir de Hidrolisado de Torta de Extração do Óleo de Milho. Caracterização Química e Avaliação da Biodisponibilidade do Ferro. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* **39** (4): 783-791,1996.

3.2. VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M.; OLIVEIRA, G.N. Métodos Analíticos para a Dosagem de Salicilatos. *Revista Lecta* **18** (1): 9-19, 2000.

3.3. VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M.; OLIVEIRA, G.N. Determination of Salicylate in Blood Serum by Flow-injection with Immobilized Salicylate Hydroxylase. *Journal AOAC International* **84** (5):1363-1369, 2001.

3.4. MAGNA, A.; SALOMÃO, A. A.; VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M. Spectrometric Analysis of Catechol in Guaraná Seeds Powder. (submetido).

3.5. MATIAS, F. A. A.; VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M. Quantitative Reflectance Spot-test Analysis of Acetyl-salicylic in Pharmaceutical Preparations. (submetido).

3.6. VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M.; MATIAS, F. A. A.; RODRIGUES, A. Acetylsalicylic Acid Determination in Remedies Using a Gas-diffusion/Flow Injection Analysis. (submetido).

3.7. MATIAS, F. A. A.; VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M. A Simple Device for Colorimetric Diffuse Reflectance Measurements. (submetido).

INDÍCE

Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Figuras.....	xviii
Capítulo I – Introdução e Objetivos.....	1
Capítulo II – Salicilatos.....	3
1. Introdução.....	3
2. Mecanismo de Ação e Aspectos Toxicológicos.....	5
3. Métodos de Dosagem de Salicilato.....	9
3.1. Métodos Espectrofotométricos.....	9
3.2. Métodos Cromatográficos.....	13
3.3. Métodos Potenciométricos.....	15
3.4. Métodos Voltamétricos.....	20
3.5. Métodos Enzimáticos.....	21
3.5.1. Métodos que Utilizam a Enzima na Forma Solúvel.....	22
3.5.2. Métodos que Utilizam a Enzima na Forma Imobilizada.....	24
Capítulo III – Enzimas.....	29
1. Introdução.....	29
2. Cinética Enzimática.....	31
2.1. Atividade Enzimática.....	36
2.2. Fatores de Influência.....	36
2.2.1. Cofatores.....	37
2.2.2. Inibição Competitiva.....	39
2.2.3. Inibição Incompetitiva.....	39
2.2.4. Inibição Não Competitiva.....	40

2.3. Fatores Ambientais de Influência.....	40
2.3.1. pH.....	41
2.3.2. Temperatura.....	41
2.3.3. Teor de Água.....	42
2.3.4. Radiações.....	43
Capítulo I V – Imobilização Enzimática.....	44
1. Introdução.....	44
2. Propriedades.....	46
3. Características dos Suportes.....	47
4. Técnicas de Imobilização.....	48
4.1. Imobilização por Oclusão em Matriz Polimérica.....	50
4.2. Imobilização por Microencapsulação.....	50
4.3. Imobilização por Adsorção.....	51
4.4. Imobilização por Ligação Covalente.....	51
4.5. Imobilização por Ligação Covalente Cruzada.....	52
Capítulo V – Biossensores e Reatores Enzimáticos	54
1. Introdução.....	54
2. Aplicações.....	57
Capítulo V I – Análise por Injeção em Fluxo (FIA).....	59
1. Introdução.....	59
2. Configuração de Sistemas.....	62
Capítulo V I I – Material e Métodos.....	64
1. Material.....	64
1.1. Preparo de Soluções.....	65
1.2. Preparo de Amostras.....	68
1.3. Aparelhos e Acessórios.....	69

2. Métodos.....	69
2.1. Métodos de Imobilização Enzimática.....	70
2.1.1. Imobilização em Esferas de Vidro em Meio Aquoso.....	70
2.1.2. Imobilização em Esferas de Vidro em Solvente Orgânico.....	71
2.1.3. Imobilização em Tubos de Náilon.....	72
2.1.4. Construção da Coluna Enzimática.....	73
2.2. Método para a Determinação de Salicilato via Detecção de Catecol e Sistema FIA.....	74
2.3. Método para a Determinação de Salicilato via Detecção de Gás Carbônico e Sistema FIA.....	74
2.4. Método Padrão.....	78
2.5. Método Titulométrico para Determinação de Ácido Acetilsalicílico.....	78
2.6. Método de Preparação da Membrana de Silicona.....	79

Capítulo VIII – Resultados e Discussão.....80

1. Introdução.....	80
2. Imobilizações Enzimáticas.....	81
2.1. Imobilização em Esferas de Vidro em Meio Aquoso.....	81
2.2. Imobilização em Tubos de Náilon.....	83
2.3. Imobilização em Esferas de Vidro em Usando Solvente Orgânico.....	84
2.3.1. Temperatura.....	86
2.3.2. Relação Molar entre NADH / Salicilato.....	87
2.3.3. Vazão.....	89
2.3.4. pH.....	90
2.3.5. Tempo de Vida do Reator Enzimático e Quantidade de Enzima Empregada.....	91
3. Determinação Espectrofotométrica de Salicilato via Detecção de Catecol.....	93
3.1. Alça de Amostragem.....	94
3.2. Comprimento da Bobina de Mistura	94

3.3. Aplicações Analíticas.....	96
3.3.1. Curva Analítica e Análise de Recuperação.....	97
3.3.2. Comparação do Método Enzimático com Determinação via Detecção de Catecol com o Método de Trinder.....	101
3.3.3. Análise de Medicamentos.....	105
4. Determinação Espectrofotométrica de Salicilato via Detecção de Gás Carbônico.....	106
4.1. Alça de Amostragem.....	107
4.2. Vazão.....	108
4.3. Comprimento da Bobina de Mistura.....	109
4.4. Concentração de Ácido Sulfúrico.....	110
4.5. Aplicações Analíticas.....	111
4.5.1. Curva Analítica e Análise de Recuperação.....	112
4.5.2. Comparação do Método Enzimático com Determinação via Detecção de Gás Carbônico com o Método de Trinder.....	115
Capítulo I X – Avaliação, Conclusões e Proposições Futuras.....	117
1. Avaliação e Conclusões.....	117
1.1. Reator Enzimático.....	118
1.2. Determinação Espectrofotométrica de Salicilato Através da Detecção de Catecol	118
1.3. Determinação Espectrofotométrica de Salicilato Através da Detecção de Gás Carbônico.....	119
2. Proposições Futuras.....	120
Referências.....	121

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Comparação entre alguns eletrodos íon-seletivos para determinação de salicilato.....19

Tabela 8.1. Recuperação de salicilato em amostras de soro pelo método enzimático.....100

Tabela 8.2. Comparação entre os resultados obtidos pelo método de Trinder e o método enzimático, usando o teste estatístico t de Student e o teste F.....102

Tabela 8.3. Comparação entre os resultados obtidos pelo método enzimático e o método titulométrico usando o teste estatístico t de Student e o teste F na dosagem de ácido acetilsalicílico em medicamentos.....105

Tabela 8.4. Recuperação de salicilato em amostras de soro pelo método enzimático.....114

Tabela 8.5. Comparação entre os resultados obtidos pelo método de Trinder e pelo método enzimático, usando o teste estatístico t de Student e o teste F.....116

Lista de Figuras

- Figura 2.1.** Metabolismo do ácido acetilsalicílico no corpo humano. As porcentagens indicam as quantidades relativas dos metabólitos na urina.....8
- Figura 2.2.** Equação da reação catalisada pela enzima salicilato hidroxilase.....21
- Figura 2.3.** Equação da reação entre catecol e 4-aminofenol.....23
- Figura 3.1.** Gráfico da velocidade de reação, V , em função da concentração de substrato em mol L^{-1} , $[S]$, para uma enzima que obedece a cinética de Michaelis-Menten.....32
- Figura 3.2.** Linearização da equação de Michaelis-Menten segundo Lineweaver-Burk.....35
- Figura 3.3.** Classificação de cofatores enzimáticos.....38
- Figura 4.1.** Formas de imobilização enzimática.....48
- Figura 4.2.** Representação esquemática de formas de imobilização de enzimas..49
- Figura 4.3.** Provável mecanismo de ligação entre o vidro silanizado e a enzima, através do glutaraldeído.....53
- Figura 5.1.** Diagrama esquemático de possíveis mecanismos de reconhecimento de um biossensor.....56
- Figura 7.1.** Recipiente para armazenamento da solução de indicador.....67

Figura 7.2. Diagrama esquemático do reator enzimático empregando enzima imobilizada em pérolas de vidro. 1- tubos de "Tygon®"; 2- lã de vidro; 3- pérolas de vidro com a enzima imobilizada.....73

Figura 7.3. Diagrama esquemático do sistema FIA proposto para a dosagem espectrofotométrica via detecção de catecol. A₁- solução de NaOH 1% (m/v); A₂- solução ácida de 4-aminofenol (m/v); A₃- tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,6); V- válvula introdutora de amostra; D- descarte; R- reator enzimático; I- alça de amostragem; S-amostra; B-bomba peristáltica; RE-registrador; E- espectrofotômetro; BR- bobina de mistura.....76

Figura 7.4. Diagrama esquemático do sistema FIA proposto para a dosagem espectrofotométrica via detecção de CO₂. A₁- tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,6); A₂ - solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹; A₃ - solução de BCP 2,5 × 10⁻⁵ mol L⁻¹; V- válvula introdutora de amostra; D- descarte; R- reator enzimático; I-alça introdutora de amostra; S-amostra; B-bomba peristáltica; RE-registrador; M-cela de difusão ou permeação gasosa; E-espectrofotômetro; BR-bobina de mistura....77

Figura 8.1. Esquema da reação do ataque ácido ao náilon.....83

Figura 8.2. Diferentes grupos silanóis encontrados nas superfícies de vidro.....85

Figura 8.3. Altura de sinal (cm) versus temperatura (20; 25; 30; 35; 40 °C). [salicilato]= 1,5×10⁻³ mol L⁻¹; vazão 0,6 mL min⁻¹; [NADH]/[salicilato]=3:1; pH 7,6, bobina de mistura 30 cm; alça de amostragem 100μL. (0,1 Absorbância = 1 cm).....84

Figura 8.4. Altura do sinal (cm) versus [NADH] / [salicilato] (1:1; 2:1; 3:1; 4:1). [salicilato]= 1,5 × 10⁻³ mol L⁻¹; vazão 0,6 mL min⁻¹; temperatura 25 °C; pH 7,6;

bobina de mistura 30 cm; alça de amostragem 100 μ L. (0,1 Absorbância = 1 cm).....88

Figura 8.5. Altura do sinal (cm) versus vazão (0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8 mL min⁻¹). [salicilato]= 2,0 \times 10⁻³ mol L⁻¹; [NADH]/[salicilato]=3:1; temperatura 25 °C pH 7,6; bobina de mistura 30 cm; alça de amostragem 100 μ L. (0,1 Absorbância = 1 cm).....89

Figura 8.6. Altura do sinal (cm) versus pH (7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8; 8,0). [salicilato]= 1,0 \times 10⁻³ mol L⁻¹; vazão de 0,6 mL min⁻¹ ; [NADH]/ [salicilato]=3:1; temperatura 25 °C; bobina de mistura 30 cm; alça de amostragem 100 μ L. (0,1 Absorbância = 1 cm).....91

Figura 8.7. Perda da atividade enzimática do reator preparado com 10 unidades de enzima. Altura de sinal (cm) versus tempo (dias). [salicilato]= 2,0 \times 10⁻³ mol L⁻¹; vazão 0,6 mL min⁻¹; [NADH]/ [salicilato]=3:1; temperatura 25 °C; pH 7,6; bobina de mistura 30 cm; alça de amostragem 100 μ L. (0,1 Absorbância = 1 cm).....93

Figura 8.8. Altura do sinal (cm) versus volume de amostra (50; 100; 150; 200 μ L). [salicilato]= 2,0 \times 10⁻³ mol L⁻¹; vazão 0,6 mL min⁻¹; [NADH]/[salicilato]=3:1; pH 7,6, temperatura 25 °C; bobina de mistura 30 cm. (0,1 Absorbância = 1 cm).....94

Figura 8.9. Altura do sinal (cm) versus comprimento de bobina (30; 60; 90; 120 cm). [salicilato]= 2,0 \times 10⁻³ mol L⁻¹; vazão 0,6 mL min⁻¹, [NADH]/[salicilato]=3:1; pH 7,6; alça de amostragem 150 μ L; temperatura 25 °C. (0,1 Absorbância = 1 cm).....95

Figura 8.10. Curva de calibração. Altura de sinal (cm) versus concentração de salicilato (mol L^{-1}). Vazão $0,6 \text{ mL min}^{-1}$; alça de amostragem $150 \mu\text{L}$; bobina de mistura 60 cm ; $[\text{NADH}]/[\text{salicilato}]=3:1$; pH $7,6$; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$. ($0,1 \text{ Absorbância} = 1 \text{ cm}$).....98

Figura 8.11. Diagrama da determinação de salicilato por detecção de catecol. Da esquerda para a direita, sinais em triplicata de padrões de salicilato ($5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5 \times \text{mol L}^{-1}$). Vazão $0,6 \text{ mL min}^{-1}$; alça de amostragem $150 \mu\text{L}$; bobina de mistura 60 cm ; $[\text{NADH}]/[\text{salicilato}]=3:1$; pH $7,6$; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$. ($0,1 \text{ Absorbância} = 1 \text{ cm}$).....99

Figura 8.12. Diagrama de análise de soro pelo método enzimático por detecção de catecol. Da esquerda para a direita, sinais em triplicata de padrões de salicilato ($1,0; 2,0; 2,5; 5,0; 5,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) intercalando-se as amostras de soro com salicilato. Vazão $0,6 \text{ mL min}^{-1}$; alça de amostragem $150 \mu\text{L}$; bobina de mistura 60 cm ; $[\text{NADH}]/[\text{salicilato}]=3:1$; pH $7,6$; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$. ($0,1 = \text{Absorbância}$).....104

Figura 8.13. Representação da estrutura do púrpura de bromocresol na sua forma ácida.....107

Figura 8.14. Altura do sinal (cm) versus volume de amostra ($150; 250; 350; 450; 500 \mu\text{L}$). $[\text{salicilato}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; vazão $0,6 \text{ mL min}^{-1}$; $[\text{NADH}]/[\text{salicilato}]=3:1$; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; pH $7,6$ bobina de mistura 35 cm ; $[\text{H}_2\text{SO}_4]=1,0 \text{ mol L}^{-1}$. ($0,1 \text{ Absorbância} = 1 \text{ cm}$).....108

Figura 8.15. Altura de sinal (cm) versus vazão ($0,3; 0,6; 0,9; 1,2 \text{ mL min}^{-1}$). $[\text{salicilato}]=1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; alça de amostragem $250 \mu\text{L}$; $[\text{NADH}]/[\text{salicilato}]=3:1$; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; pH $7,6$ bobina de mistura 35 cm ; $[\text{H}_2\text{SO}_4]=1,0 \text{ mol L}^{-1}$. ($0,1 \text{ Absorbância} = 1 \text{ cm}$).....109

Figura 8.16. Altura de sinal (cm) versus bobina de mistura (30; 35; 40; 45; 50 cm). [salicilato] = $1,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; vazão 0,6 mL min⁻¹; alça de amostragem 250 µL; [NADH]/[salicilato]=3:1; temperatura 25 °C; pH 7,6; [H₂SO₄]=1,0 mol L⁻¹. (0,1 Absorbância = 1 cm).....110

Figura 8.17. Altura de sinal (cm) versus concentração de ácido sulfúrico (0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mol L⁻¹). [salicilato]= $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; alça de amostragem 250 µL; [NADH]/[salicilato]=3:1; temperatura 25 °C; vazão 0,6 mL min⁻¹; pH 7,6; bobina de mistura 45 cm. (0,1 Absorbância = 1 cm).....111

Figura 8.18. Curva de calibração. Altura de sinal (cm) versus concentração de salicilato (5,0; 3,0; 2,0; 1,0; 0,5 ×10⁻³ mol L⁻¹). Vazão 0,6 mL min⁻¹; alça de amostragem 250 µL; [NADH]/[salicilato]=3:1; temperatura 25 °C; pH 7,6; bobina de mistura 45 cm; [H₂SO₄]=1,0 mol L⁻¹. (0,1 Absorbância = 1 cm).....113

Figura 8.19. Diagrama de determinação de salicilato por detecção de gás carbônico. Da esquerda para a direita sinais em triplicata de padrões de salicilato (5,0; 3,0; 2,0; 1,0; 0,5×10⁻³ mol L⁻¹). Vazão 0,6 mL min⁻¹; alça de amostragem 250 µL; [NADH]/[salicilato]=3:1; temperatura 25 °C; pH 7,6; bobina de mistura 45 cm; [H₂SO₄] = 1,0 mol L⁻¹. (0,1 Absorbância = 1 cm).....113

Figura 8.20. Diagrama das análises de soro. Da esquerda para a direita, sinais em triplicata de padrões de salicilato (0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0×10⁻³ mol L⁻¹) intercalando-se amostras de soro com salicilato. Vazão 0,6 mL min⁻¹; alça de amostragem 250 µL; [NADH]/[salicilato]=3:1; temperatura 25 °C; pH 7,6; bobina de mistura 45 cm; [H₂SO₄]=1,0 mol L⁻¹. (0,1 Absorbância= 1 cm).....115

Capítulo I

Introdução e Objetivos

Os salicilatos são substâncias que possuem propriedades analgésicas, antiinflamatórias e antipiréticas. Dentre inúmeros derivados, o ácido acetilsalicílico, é um dos mais empregados, sendo utilizado em diferentes formulações farmacêuticas (Payan, 1994). No Brasil, de acordo com o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas 2000/01 (DEF, 2000/01), encontram-se registrados 27 medicamentos contendo apenas ácido acetilsalicílico, e outros 23 em associações a outros fármacos, principalmente cafeína e vitamina C que podem ser adquiridos sem prescrição médica. Além das indicações já amplamente conhecidas também tem se mostrado eficaz no tratamento de problemas cardíacos e circulatórios. O ácido salicílico é o principal metabólito resultante da hidrólise do ácido acetilsalicílico e sua determinação é de grande importância na clínica médica, uma vez que o nível terapêutico mais elevado é muito próximo ao da toxicidade. Os níveis recomendados, no plasma, situam-se na faixa de $1,1 \times 10^{-3}$ a $2,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (150 a 300 mg L⁻¹). Valores superiores a 300 mg L⁻¹ são considerados tóxicos podendo levar a morte valores acima de $4,3 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (600 mg L⁻¹). (Yip, et al., 1997). Além disto, em função de sua grande disponibilidade, o ácido acetilsalicílico tem uma longa história de intoxicação humana vinda de ingestão acidental, "overdose" intencional ou ainda, em decorrência de tratamentos prolongados.

Diversos métodos têm sido citados para a dosagem de salicilato em produtos farmacêuticos e fluídos biológicos. Dentre eles, os métodos enzimáticos têm surgido como uma opção de análise rápida e seletiva, principalmente para a determinação de salicilato em matrizes complexas. A enzima *salicilato hidroxilase* converte salicilato a catecol e gás carbônico na presença da coenzima NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e oxigênio molecular. Assim, o consumo de

NADH ou de oxigênio, ou a formação de catecol ou de gás carbônico podem ser monitorados, relacionando-se a sua concentração com a de salicilato.

O desenvolvimento de técnicas para a imobilização enzimática favoreceu os métodos enzimáticos em química analítica. A possibilidade de reutilização das mesmas em diversas análises promoveu a redução dos custos e facilitou o uso de sistemas contínuos.

No presente trabalho, visando a "automação" do procedimento analítico optou-se pela técnica de injeção em fluxo. A análise por injeção em fluxo permite a "automação" do processo analítico tendo como características principais: simplicidade na instrumentação, economia de amostras e reagentes e agilidade no processamento, permitindo a utilização em situações de grande demanda de amostras.

Com estes fatos em mente, objetivou-se desenvolver, neste projeto, métodos para a determinação de salicilato em soro sanguíneo e em medicamentos, empregando reação enzimática e sistema de injeção em fluxo. Assim, para atingir tal objetivo, o plano de trabalho seguido, depois de adequada revisão bibliográfica, ficou assim organizado:

- Escolha de suportes e condições adequadas para a imobilização da enzima *salicilato hidroxilase*.
- Estudo de diferentes formas de análise de salicilato a partir dos produtos gerados na reação enzimática (gás carbônico e catecol).
- Avaliação das condições ideais para a eficiência dos métodos propostos visando exatidão, precisão, rapidez e simplicidade operacional.

Capítulo II

Salicilatos

1. Introdução

Os salicilatos incluem-se entre os mais antigos fármacos, que ainda ocupam lugar de destaque na terapêutica moderna. Estão presentes em diversas espécies vegetais, principalmente no salgueiro (gênero *Salix*), sendo estas utilizadas por várias civilizações, há séculos. Sobre a cura de dores e febres há registros de experiências realizadas por Hipócrates no século V a.C. com um pó amargo extraído da casca do salgueiro. No século XVIII, havia relatos do uso da casca de salgueiro para alívio da febre e de dores. Em 1763, o reverendo Edward Stone comunicou à "Royal Society" de Londres o uso da casca de salgueiro branco (*Salix alba*) como antipirético e sedativo com grande sucesso. Entretanto somente cerca de sessenta anos mais tarde este fato empírico passou a ser pesquisado cientificamente. Em 1829 um farmacêutico francês, H. Leroux, isolou a salicina, de casca de salgueiro, que por hidrólise fornece glicose e álcool salicílico. Estes estudos permitiram que em 1838, R. Piria, um químico alemão, preparasse o ácido salicílico a partir da salicina (Rodnan & Benedek, 1970; Moraes, 1986).

O ácido acetilsalicílico foi sintetizado em 1853 pelo químico alemão Charles Frederic Gerhardt, entretanto, a falta de confirmação de sua eficiência medicamentosa retardou seu emprego. Coube à "Farbenfabriken vorm. Friedrich Bayer & Co" aperfeiçoar seus ensaios. O trabalho foi confiado a Felix Hoffman, um farmacêutico cujo pai sofria de reumatismo crônico e tinha problemas gástricos pelo uso do ácido salicílico. Em 1887 Hoffman obteve o ácido acetilsalicílico, trabalhando sob a direção de Arthur Eischengrün, que anos mais tarde reivindicou

a descoberta para si. Foi introduzido na prática médica em 1899, após testes farmacológicos e clínicos, sob o nome de "aspirina" (fusão do prefixo "a" do grupo acetil com "spirin", em alusão a *Spirala ulmária*, nome da planta usada como base para as pesquisas. O ácido acetilsalicílico teve grande aceitação na administração oral em função de sua maior eficiência, maior tolerabilidade gástrica e paladar mais agradável. Em virtude de sua eficácia e menor custo, a aspirina®* substituiu os produtos naturais então em uso (Ferreira, 1985; Moraes, 1986; Nietsch, 1989; Payan, 1994). Atualmente, o ácido acetilsalicílico é oferecido por diversas empresas, com diferentes marcas comerciais, sendo administrado por via oral, na forma de pó, cápsulas ou comprimidos ou por via retal, na forma de supositórios. Os salicilatos também são empregados em formulações como sabonetes, cremes, loções dérmicas e xampus em função de sua ação queratolítica (ácido salicílico) para tratamentos de epidermofitoses e remoção de calos e verrugas e por sua ação contra-irritante (salicilato de metila) para tratamentos de dores articulares ou musculares (Insel, 1991).

Os salicilatos possuem propriedades analgésicas, antiinflamatórias e antipiréticas, sendo que, entre seus derivados, o ácido acetilsalicílico é um dos mais populares. O ácido acetilsalicílico é o protótipo do grupo dos antiinflamatórios não esteróides (AINE), sendo considerado o fármaco de primeira escolha como agente terapêutico inicial na artrite reumatóide e em outras afecções articulares inflamatórias. É a droga padrão com a qual são comparados todos os outros agentes antiinflamatórios (Kimberly & Plotz, 1989).

Além das indicações já amplamente conhecidas, o ácido acetilsalicílico tem se mostrado eficaz no tratamento de diversos problemas cardíacos e disfunções circulatórias. O uso do ácido acetilsalicílico em terapias para pacientes com inúmeros problemas cardíacos, tem se mostrado como opção de baixo custo e riscos reduzidos, com evidente benefício terapêutico (Baigent et al., 1998; Eccles et al., 1998; Krumholz et al., 1998; Borzark et al., 1998; Al-Kadra et al., 1998).

* aspirina® é marca registrada da Bayer AG

Além disto, outras aplicações têm sido pesquisadas, como a diminuição dos riscos e da recorrência de câncer de colo de reto (Janssen et al., 1996).

2. Mecanismo de Ação e Aspectos Toxicológicos

Os efeitos terapêuticos do ácido acetilsalicílico (antiinflamatório, analgésico e antipirético) e de outros agentes antiinflamatórios não esteróides (AINE) foram melhor explicados, no início da década de 70, através da comprovação que tais compostos atuam inibindo a síntese de prostaglandinas. Estas substâncias são responsáveis pelo desencadeamento do processo inflamatório. O ácido acetilsalicílico tem a capacidade de inibir a ciclo-oxigenase, enzima responsável pelo início da cadeia de síntese das prostaglandinas. Com isso, são eliminados ou atenuados todos os sinais e sintomas ocasionados pela liberação de prostaglandinas como a hiperalgesia, o edema e a febre.

As prostaglandinas não causam edema nas concentrações encontradas nos exudatos inflamatórios, mas potencializam a ação edematogênica de outros mediadores inflamatórios tais como: a bradiginina e a histamina. Esta ação explica porque os fármacos do tipo aspirina somente reduzem, mas não abolem a resposta ao estímulo inflamatório, não impedindo a progressão da injúria patológica. As prostaglandinas sensibilizam os receptores da dor (nociceptores) a estímulos mecânicos ou químicos. Assim, fármacos do tipo da aspirina® são, geralmente, eficazes contra dores de baixa a moderada intensidades, particularmente quando associadas à inflamações.

O processo inflamatório localizado freqüentemente é acompanhado de febre, a qual, assim como a dor, informa que algo anda errado no organismo. Toma-se, deste modo, consciência da dor inflamatória, isto porque os nervos sensitivos da dor possuem conexões com o sistema nervoso central. Com a febre, no entanto, a via é outra. O comando para a febre se inicia no sistema nervoso

central, mais precisamente no hipotálamo. Além dos processos vasculares (eritema e edema), ocorre na região inflamada uma invasão de células brancas sangüíneas com a função de remover o estímulo agressor (bactérias, corpos estranhos, etc.) e restos de tecidos lesados. Estas células fagocitam e digerem as partículas estranhas. Neste processo, as células brancas liberam substâncias denominadas pirogênio endógeno, que caem na circulação e se distribuem por todo o organismo, chegando até o sistema nervoso central, onde estimulam a liberação de prostaglandinas. Os centros reguladores da temperatura são sensíveis às prostaglandinas que os desregula, provocando uma leitura equivocada da temperatura do sangue (sempre mais fria), desencadeando os mecanismos de produção e conservação de calor (vasoconstrição cutânea e tremores musculares). As drogas do tipo da aspirina®, ao bloquearem a síntese das prostaglandinas do sistema nervoso central, "reacertam" o termostato corporal, que passa a promover um aumento da dissipação do calor (Ferreira, 1985).

Alguns efeitos adversos do ácido acetilsalicílico também podem ser explicados pela inibição da síntese das prostaglandinas. O ácido acetilsalicílico afeta a homeostase promovendo o prolongamento do tempo de sangramento, através da inibição da função qualitativa plaquetária. O ácido acetilsalicílico acetila irreversivelmente a ciclo-oxigenase plaquetária. Essa inibição permanece por todo o tempo de vida das plaquetas em circulação, já que estas são desprovidas de núcleo e, portanto, incapazes de sintetizar nova ciclo-oxigenase (Araújo & Mattos Filho, 1996).

Distúrbios gástricos estão entre os efeitos colaterais mais freqüentes em decorrência de terapias com drogas do tipo da aspirina®. Atualmente se admite que na parede do estômago ocorre uma formação contínua de prostaglandina do tipo E_2^* , que participa do controle da circulação existente na rede capilar local.

* A enzima ciclo-oxigenase induz a formação de diversos tipos de endoperóxidos cíclicos, entre eles a prostaglandina do tipo E_2 . A direção preferencial de síntese varia dependendo do tipo de célula ou tecido envolvido (Ferreira, 1985).

Assim, a ausência desta substância pode acarretar uma diminuição das redes capilares em ação na mucosa gástrica, com decorrente perda da proteção à agressão causada pelo ácido clorídrico, presente no suco gástrico, que normalmente reflui para o interior da mucosa. Com a funcionalidade da rede capilar diminuída há, também, uma diminuição do transudato capilar encarregado de tamponar este refluxo, acarretando erosões na mucosa (Ferreira, 1985).

A absorção do salicilato ocorre no estômago e na porção proximal do intestino delgado, sendo a concentração sérica máxima de salicilato alcançada dentro de 1 a 2 horas. O ácido acetilsalicílico é absorvido como tal, sendo hidrolisado em sua maior parte em ácido salicílico por esterases existentes nos tecidos e no sangue. O ácido acetilsalicílico é excretado pelos rins na forma de ácido salicílico (99 %) e seus principais metabólitos, e na forma de ácido gentísico em quantidades bem menores (1 %) (figura 2.1) (Nietsch, 1989; Payan, 1994).

A faixa de concentração no soro ou no plasma necessária para a obtenção do melhor efeito antiinflamatório é de $1,1 \times 10^{-3}$ a $2,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (150 a 300 mg L^{-1}). Entretanto, é estreita a margem terapêutica superior da aspirina®, pois os primeiros sinais de intoxicação salicílica aparecem, com frequência, quando os níveis, plasmáticos estão próximos de $2,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (300 mg L^{-1}). A intoxicação leve pelo salicilato é chamada salicilismo. Geralmente é consequência da administração repetida de altas doses, como ocorre no tratamento da artrite reumatóide juvenil.

Os sinais e sintomas do salicilismo consistem de dores de cabeça, tonturas, letargia, confusão mental, náuseas, vômitos, hiperventilação, zumbido, surdez para sons agudos, obscurecimento da visão e, às vezes, diarreia. À medida que o grau de intoxicação aumenta, as alterações do metabolismo ácido-base se acentuam e as manifestações neurológicas podem levar ao delírio, alucinações, convulsões, torpor e coma. A morte geralmente ocorre devido à acentuada depressão do sistema nervoso central e está relacionada com paralisia respiratória central e colapso cardiovascular (Yip et al., 1997).

Outro fator de relevância é que pacientes tratados com mesma dose de ácido acetilsalicílico mostram diferenças significativas na salicilemia. Tal variação é consequência da acumulação não linear, característica dos salicilatos, bem como diferenças interindividuais na cinética de sua eliminação (Moraes & Sznelwar, 1987). Desta forma, a análise segura e rápida de salicilato no sangue é de suma importância na clínica médica. Para que a terapia seja eficiente e com baixos riscos de intoxicação surge a necessidade, seja no caso de pacientes com tratamentos prolongados ou nas enfermidades crônicas, de um ajuste da dose do medicamento para cada indivíduo, com base nos valores de salicilemia.

A demanda de acetilsalicílico é bastante elevada, sendo estimado que somente nos Estados Unidos 10.000 a 20.000 toneladas de ácido acetilsalicílico são consumidos por ano (Marcus & Broekman, 1998). Assim, em virtude da grande acessibilidade deste fármaco, inúmeros casos de intoxicação, principalmente em crianças pequenas não são raros. Teores superiores a $2,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (300 mg L^{-1}) são considerados tóxicos, usualmente, sendo fatais acima de $4,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (600 mg L^{-1}) (Proudfoot, 1983; Yip et al., 1997).

Soma-se a isto a necessidade do controle de qualidade destes fármacos durante sua produção e estocagem.

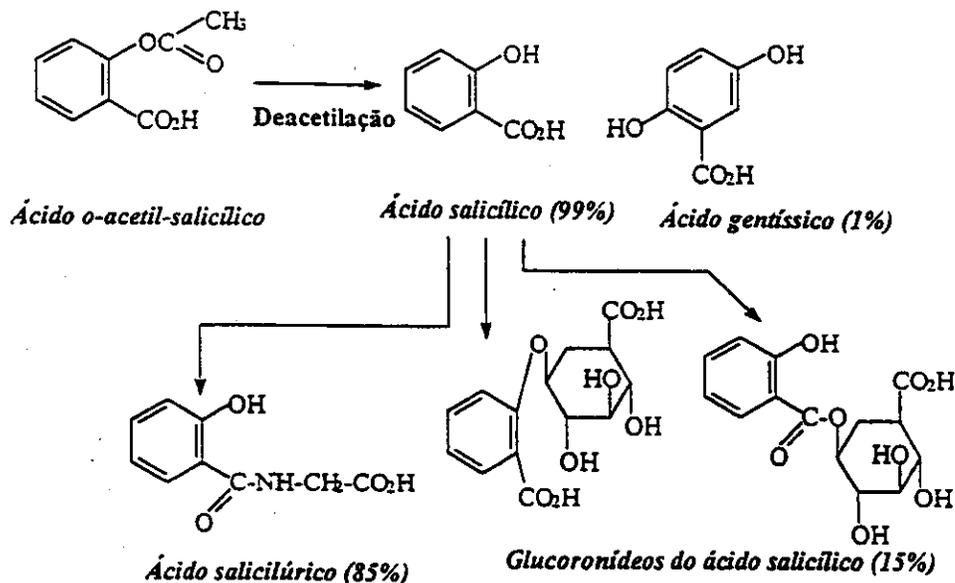


Figura 2.1. Metabolismo do ácido acetilsalicílico no corpo humano. As porcentagens indicam as quantidades relativas dos metabólitos na urina. Fonte: Niestch, 1989.

3. Métodos de Dosagem de Salicilato

Diversos métodos são apresentados na literatura para determinação de salicilato em produtos farmacêuticos e em fluidos biológicos, que podem ser agrupados de acordo com o princípio de determinação.

3.1. Métodos Espectrofotométricos

Desde a década de 40 já havia a consciência da necessidade do controle das taxas séricas de salicilato para ajuste da dose eficaz, sendo que os primeiros métodos propostos foram os colorimétricos. Algumas destas técnicas foram baseadas na complexação do grupo fenólico do ácido salicílico com íons férricos, em solução levemente ácida, formando uma espécie de cor púrpura (Orozco & Guerra, 1946; Keller, 1947; Tarnakoy & Brews, 1951; Trinder, 1954; Barbezat, 1955). Acredita-se que a coloração desenvolvida se deva a formação de um íon complexo por interação simultânea entre os grupamentos carboxila e hidroxila do ácido salicílico e o Fe^{3+} (Alvarez-Ros et al., 2000).

Outros métodos empregaram redução do reagente de Folin-Ciocalteu pela hidroxila fenólica do ácido salicílico, em solução alcalina, resultando uma coloração azul (Smith & Talbot, 1950; Weichselbaum & Shapiro, 1945).

Dos métodos acima citados, os mais adequados são aqueles que utilizam a complexação com íons férricos, pois os que utilizam a redução do reagente de Folin-Ciocalteu fornecem elevados valores de branco. Além do mais, esta reação ocorre para diversas drogas com ou sem grupamentos fenólicos, podendo gerar interferências (Rao et al., 1978). O teste de Trinder (Trinder, 1954) é o mais utilizado entre todos os métodos espectrofotométricos, sendo considerado o método de referência na avaliação de novas técnicas. É bastante sensível, podendo atingir limites de determinação da ordem de 10^{-5} mol L^{-1} , dependendo da matriz. É um método simples e de baixo custo mas sofre interferências de

compostos alifáticos enólicos, fenólicos e de outras drogas como as fenotiazinas (Kang et al., 1983), podendo apresentar grande variação interlaboratorial (Mutchie et al., 1980). Com o avanço da tecnologia na década de 80, técnicas colorimétricas, baseadas na reação de Trinder foram utilizadas para o desenvolvimento de equipamentos automatizados (Eckfeldt & Nelson, 1983; Landek, 1985; Peltonen & Shamma, 1986).

Empregando o princípio de Trinder e sistema de análise por injeção em fluxo, Koupparis e Anagnostopoulou (Koupparis & Anagnostopoulou, 1988) dosaram, em soro e medicamentos, diversos compostos como: salicilato de sódio, salicilamida, metilsalicilato e ácido acetilsalicílico. O método empregou um sistema de dissolução automatizada integrada ao percurso analítico para a dissolução dos medicamentos. Os resultados permitiram a dosagem em amostras de soro dopadas com salicilato numa faixa de $0,72 \times 10^{-3}$ a $7,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (100 a 1000 mg L⁻¹) com recuperação média de 99,3%. As análises dos medicamentos apresentaram correlação com o método titulométrico (USP Pharmacopoeia) com uma diferença de 0,4 a 1,5 %. A maior vantagem do método é a elevada frequência de amostragem com uma taxa de 95 a 180 determinações por hora dependendo das etapas de diluição.

Em outro trabalho semelhante, López-Fernández e colaboradores (López-Fernández et al., 1990) propuseram um reator para a dissolução dos comprimidos no percurso analítico com resposta linear na faixa de $1,67 \times 10^{-3}$ a $10,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (300 a 1800 mg L⁻¹) para ácido acetilsalicílico e de $0,72 \times 10^{-3}$ a $4,3 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (100 a 600 mg L⁻¹) para ácido salicílico. A grande vantagem destes métodos residiu, sem dúvida, na integração dos processos de dissolução nos sistemas de fluxo. Normalmente estas etapas, seguindo técnicas descritas em farmacopéias (Farmacopéia Brasileira, 1988; The United States Pharmacopoeia, 1985), são demoradas e trabalhosas.

Karlicek e colaboradores (Karlicek et al., 1996) propuseram a determinação espectrofotométrica através da reação de Trinder em sistema de injeção em fluxo e uso de uma coluna para extração (coluna de extração em fase sólida), para

análise de amostras biológicas (urina e plasma). O método apresentou uma faixa linear de resposta para concentrações de salicilato na faixa de 10^{-6} a 10^{-3} mol L⁻¹. O uso da coluna foi uma alternativa que permitiu utilizar amostras sem pré-tratamento, com a possibilidade de concentração do analito e aumento da sensibilidade pela remoção de interferentes.

O princípio da reação de Trinder também tem sido empregado em "spot test" para determinação de salicilato em urina e sangue, em situações de emergência, visando uma determinação qualitativa com rapidez e redução de custos (Asselin & Caughlin, 1990; King et al., 1995; Charette et al., 1998).

A capacidade dos salicilatos formarem complexos coloridos foi também utilizada por Guidi e colaboradores (Guidi et al., 1983). Os pesquisadores desenvolveram método espectrofotométrico para dosagem de salicilato em amostras biológicas utilizando a reação de Berthelot "reversa", onde um excesso de cloramina reage, em meio alcalino, com salicilato formando um composto verde (2, 2' - dicarboxiindofenol). Embora este método tenha apresentado faixa linear de resposta entre $1,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e limite de detecção de $35,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, esta técnica não tem sido citada. Isto talvez seja devido ao fato de ser necessário o uso de solventes, para a extração do analito, e aquecimento a 37°C por 15 minutos para desenvolvimento da cor.

Um outro método, com determinação espectrofotométrica de salicilato em produtos farmacêuticos foi descrito por Saha e Baksi (Saha & Baksi, 1985). A técnica se baseia na formação de um composto verde amarelado pela reação entre ácido salicílico e acetato de cobre (II), em meio levemente ácido (5,5-6,0). A faixa de resposta linear obtida foi entre $1,5 \times 10^{-3}$ a $2,9 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de salicilato. Entretanto, observou-se que a reação podia sofrer algumas interferências de compostos presentes nas formulações. Para eliminá-las, os autores sugeriram processos de extração com solventes, o que implica em maior tempo de análise.

Técnicas espectrofotométricas de fluorescência para a dosagem de salicilatos foram também empregadas (Miles & Schenk, 1970; Kleinerman, 1977; Gui-Yun & Jing-He, 1984; Moraes & Sznalwar, 1987; Bailey et al., 1987). De modo

geral, são consideradas como mais sensíveis e mais específicas quando em comparação com métodos colorimétricos. Alguns destes métodos fluorimétricos baseiam-se na complexação do salicilato com térbio (Kleinerman, 1977; Gui-Yun & Jing-He, 1984; Bailey et al., 1987).

Trabalhos mais recentes (Salinas et al., 1990; Konstantianos & Ioannou, 1992; Pulgarian & Molina, 1994; Villari et al., 1994) utilizado-se de técnicas fluorimétricas, determinaram simultaneamente ácido salicílico e derivados em diversas matrizes complexas, de modo bastante preciso, porém, envolvendo sucessivas extrações e exigindo tratamentos matemáticos laboriosos.

Por sua vez, a espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) pode também ser utilizada para determinação de salicilatos (Stevenson, 1960; Kitamura & Majima, 1983; Dumitrescu et al., 1996). Entretanto, em comparação com métodos colorimétricos que usam a região visível do espectro sua aplicação tem sido menor, talvez, em função de interferências de substâncias endógenas e ainda, a necessidade de solventes extratores.

Outros métodos empregados para o controle de qualidade em fármacos com salicilatos também têm sido apresentados. Podendo-se citar alguns trabalhos, tais como os de Garrigues e colaboradores (Garrigues et al., 1993), de Chattaraj e Das (Chattaraj & Das, 1993) e de Rivas e Calatayud (Rivas & Calatayud, 1995).

Garrigues e colaboradores (Garrigues et al., 1993) empregaram determinação simultânea de ácido acetilsalicílico e cafeína por espectrofotometria de infravermelho transformada de Fourier acoplada em sistema em fluxo.

Também empregando injeção em fluxo Rivas e Calatayud (Rivas & Calatayud, 1995) utilizaram um reator, integrado ao sistema, contendo carbonato de cobre incorporado em resina de poliéster. Neste reator, ocorre a formação de um complexo entre o salicilato da amostra e o cobre da resina. A determinação deste cobre complexado é feita por absorção atômica. A curva de calibração é linear entre $2,9 \times 10^{-5}$ a $5,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ácido salicílico.

Chattaraj e Das (Chattaraj & Das, 1993) apresentaram uma técnica desenvolvida para a dosagem de salicilato em produtos farmacêuticos,

especialmente pomadas. Empregaram absorção atômica com determinação indireta do analito. O método se baseia na formação de um complexo entre o ácido salicílico e cobalto. É feita a extração deste complexo com solvente orgânico e a quantidade de cobalto ligado é determinada por absorção atômica. O limite de detecção é da ordem de $1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (22 ng mL^{-1}).

De modo geral, os maiores problemas destes métodos estão relacionados à presença de substâncias que podem gerar interferências no sistema. Para a solução destes problemas, muitas vezes, procedimentos de preparo de amostras são empregados. A necessidade de eliminação destes interferentes torna estes métodos mais trabalhosos e lentos, portanto inadequados para análises rápidas.

3.2. Métodos Cromatográficos

Diversas técnicas cromatográficas têm sido propostas na separação e determinação de salicilato em fluídos biológicos e preparações farmacêuticas.

Num dos primeiros trabalhos, a cromatografia em camada delgada foi utilizada para a separação de ácido acetilsalicílico e ácido salicílico com posterior análise por reflectância no UV (Frodyma et al., 1965). Foram observadas, para cada um dos componentes, curvas lineares de calibração para concentrações acima de $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Mais recentemente, a cromatografia em camada delgada foi aplicada como teste qualitativo. Foi utilizada para a detecção e diferenciação de salicilatos e seus metabólitos em urina apresentando limite de detecção de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Kincaid et al., 1991).

A cromatografia líquida em fase reversa também foi uma técnica empregada para a dosagem de salicilato em plasma sanguíneo. Apresentou um limite de detecção de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (18 mg L^{-1}) para ácido acetilsalicílico e $2,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($3,3 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$) para ácido salicílico (Khalil & Gonnet, 1983).

Mais recentemente, McMahon e Kelly (McMahon & Kelly, 1998) empregaram a técnica de cromatografia líquida com extração em fase sólida para a determinação simultânea de ácido acetilsalicílico e ácido salicílico em plasma sanguíneo visando melhorar os níveis de determinação. Os foram resultados bastante satisfatórios com faixa de resposta linear de $0,5 \times 10^{-8}$ a $3,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (0,1 a 5,0 µg mL⁻¹) para ácido acetilsalicílico e $1,4 \times 10^{-5}$ a $8,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (0,25 a 15,0 µg mL⁻¹) para ácido salicílico, respectivamente.

A cromatografia gás-líquido (CGL) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são, dentre as técnicas cromatográficas, as de maior emprego na dosagem de salicilato. Têm sido usadas para a análise de matrizes biológicas ou para a determinação simultânea de vários compostos em diversas formulações farmacêuticas, podendo-se citar inúmeros trabalhos (Ali, 1976; Bekersky et al., 1977; Blair et al., 1978; Cham et al., 1979; Amick & Mason, 1979; Miceli et al., 1979; Santos et al., 1980; Lo & Bye, 1980 Ou & Frawley, 1982; Buskin et al., 1982; Mason & Gillilan, 1983; Bevitt et al., 1984; Kees et al., 1996; Pirola et al., 1998). A CLAE é uma técnica bastante sensível, que permite detectar salicilatos em concentração de até 50 µg L⁻¹, mesmo em matrizes complexas.

Vários outros métodos cromatográficos têm sido desenvolvidos para a determinação de salicilato. Por exemplo, a cromatografia de eletroforese capilar (Goto et al., 1998) e a cromatografia líquida capilar acoplada a espectrômetro de massas (Wilbert et al., 1998). Estas técnicas apresentaram faixa linear de resposta entre 10^{-6} e 10^{-4} mol L⁻¹, para ácido salicílico e ácido acetilsalicílico. A cromatografia de eletroforese capilar já foi aplicada para identificação qualitativa de salicilato em pacientes intoxicados. Entretanto, o tempo de análise, de cerca de trinta minutos pode ser muito longo para análises em casos de urgência (Caslavska et al., 1993). Ainda pode-se citar o emprego da cromatografia de eletroforese capilar para a determinação e identificação de salicilato e derivados em urina numa faixa de até 10^{-5} mol L⁻¹ (10 µg L⁻¹) em método desenvolvido por Zaugg e colaboradores (Zaugg et al., 2001).

A técnica de cromatografia de troca-iônica, associada a um tipo especial de detector condutométrico, também foi aplicada na determinação de salicilato em plasma sanguíneo com resposta linear na mesma faixa de concentração das técnicas acima mencionadas, ou seja, entre 10^{-6} a 10^{-4} mol L⁻¹ de salicilato (5 a 100 mg L⁻¹) (Bing-Sheng et al., 1997).

De modo geral, o uso de métodos cromatográficos exige, normalmente, inúmeros tratamentos da amostra, tais como: extração, pré-concentração, derivação (para cromatografia gasosa), entre outros. Os tempos de eluição são demorados, consumindo de dez a trinta minutos ou mais. Além disto, o uso de aparelhagem sofisticada e recursos humanos especializados limitam o emprego destas técnicas e as tornam pouco atraentes para a análise de rotina. Porém, tais métodos permitem monitorar simultaneamente o analito na presença de inúmeros interferentes com elevado grau de sensibilidade.

3.3. Métodos Potenciométricos

Com a evolução dos eletrodos íon-seletivos, vários eletrodos seletivos sensíveis a salicilato foram desenvolvidos, a partir da década de 70.

Os eletrodos íon-seletivos, na sua grande maioria, têm sido descritos para a dosagem de salicilato em produtos farmacêuticos (Haynes & Wagenknecht, 1971; James et al., 1972; Ishibashi et al., 1973; Choi & Fung, 1982; Mitsana-Papazoglou et al., 1984; Chan et al., 1986; Hassan & Hamada, 1998; Pereira et al., 1990; Lima et al., 1990; Stefan et al., 1997; Rover Jr. et al., 1998; Egorov et al., 1998; Ferreira et al., 1999; Kubota et al., 1999; Torres et al., 2001). A aplicação destes em fluidos biológicos, no entanto, é problemática, pois sofrem interferências de ânions, como iodeto, brometo e nitrato, presentes, normalmente, em fluidos biológicos.

As determinações oficiais de ácido salicílico e ácido acetilsalicílico prescritas pela Farmacopéia Brasileira (Farmacopéia Brasileira, 1988) e Farmacopéia Americana (The United States Pharmacopoeia, 1985) são baseadas em métodos titulométricos

envolvendo titulações ácido-base (no caso do ácido acetilsalicílico após hidrólise alcalina). Assim, métodos potenciométricos diretos seriam uma opção mais simples e rápida em comparação com o método titulométrico. O uso de eletrodo íon-seletivo apresenta boas características analíticas para a dosagem de medicamentos a base de salicilato, como pode ser visualizado na tabela 2.1 (página 19).

Diversos métodos têm sido empregados para a construção de eletrodos sensíveis a salicilato. Num dos primeiros trabalhos, Haynes e Wageknecht (Haynes & Wageknecht, 1971) desenvolveram um eletrodo tipo membrana líquida, com o trocador iônico tetra-heptil-amônio em 1-decanol. Em 1972, um eletrodo tipo coated wire (microeletrodo em fio recoberto) sensível a salicilato (James et al., 1972) foi construído baseado no trocador iônico tricaprilil-trimetil-amônio (Aliquat® 336S) incorporado em 1-decanol. Posteriormente, Ishibashi e colaboradores (Ishibashi et al., 1973) apresentaram eletrodo de membrana de PVC (cloreto de polivinila) contendo trocador iônico Aliquat® 336S.

Na década de 80, vários outros eletrodos seletivos para salicilato também foram descritos. Podemos citar vários trabalhos como o de Choi e Fung (Choi & Fung, 1982) que desenvolveram um eletrodo íon-seletivo com membrana de PVC, e trocador iônico Aliquat® 336S em dibutilftalato, para dosagem de salicilato. Método semelhante foi utilizado para a construção de um eletrodo íon-seletivo para salicilato do tipo membrana líquida, baseado em haletos de tetralquilamônio e p-nitrocumeno (Mitsana-Papazoglou et al., 1984). Posteriormente, outro eletrodo de membrana de PVC, baseado num trocador de cristal de violeta-salicilato foi desenvolvido (Chan et al., 1986). Hassan e Hamada (Hassan & Hamada, 1988), apresentaram eletrodo sensível a salicilato tipo membrana líquida com trocador iônico 4,5-dihidro-1,4-difenil-3,5-fenil-imino-1,2,4-triazole incorporado em nitrobenzeno. No final dos anos 80, Pereira e colaboradores (Pereira et al., 1989),

desenvolveram eletrodo baseado na deposição da membrana do material ativo (complexo aliquat-salicilato) sobre vidro condutor.

Eletrodos seletivos associados a sistemas analíticos de fluxo tem tido um crescente desenvolvimento, havendo um significativo aumento, particularmente a partir de 1984 (Couto & Montenegro, 2000). Eletrodos tubulares potenciométricos associados a sistemas de fluxo tem sido estudados, podendo-se citar os eletrodos que empregam trocadores iônicos como salicilato de tetraoctil-amônio imobilizados em PVC (Lima et al., 1990) e Aliquat® 336S incorporado em copolímero de etilenoacetato de vinila (EVA) (Rover Jr. et al., 1998; Kubota et al., 1999; Torres et al., 2001). Estes eletrodos foram desenvolvidos para determinações de salicilato em preparações farmacêuticas, sendo úteis em sistemas FIA, pois apresentaram tempos curtos de resposta (5 segundos a 25° C) e curva de calibração entre 10^{-3} e 10^{-1} mol L⁻¹ de salicilato.

Stefan e colaboradores (Stefan et al., 1997) em revisão da literatura fizeram uma avaliação do desempenho de alguns eletrodos íon-seletivos empregados para análise de diversos produtos farmacêuticos. Para a dosagem de salicilato apontaram o uso de um eletrodo com membrana pseudo-líquida preparada com Aliquat® 336S. Pode-se citar, também, o eletrodo desenvolvido por Ferreira e colaboradores (Ferreira et al., 1999) para a dosagem de salicilato em preparações farmacêuticas com o agente ativo imobilizado em superfície de grafite.

Um fator limitante ao uso de eletrodos íon-seletivos na determinação de salicilato em matrizes complexas, como já dito, é o grande número de interferentes. Entretanto, atualmente, pesquisas têm sido dirigidas visando o desenvolvimento de eletrodos íon-seletivos para dosagem de salicilato que possam ser também utilizados para análises em fluidos biológicos. Desta forma, Chang e Meyerhoff (Chang & Meyerhoff, 1996) desenvolveram um sistema que empregava eletrodo tubular de membrana de PVC com trocador Aliquat® 336S, sensível a salicilato, integrado em sistema de fluxo contínuo com membrana dialisadora de PTFE para eliminação de interferentes. Deste modo, foi possível a análise de amostras de soro, com resposta linear na faixa de concentração de 10^{-4} a 10^{-2}

mol L⁻¹ de salicilato. Visando ainda, a determinação de salicilato em fluidos biológicos, outras membranas sensoras foram desenvolvidas. Eletrodos empregando membranas sensoras com trocador aniônico heptil-4-trifluoroacetilbenzoato (Katsu & Mori, 1996), ou ionóforo contendo o íon guanidínico (Hutchins et al., 1997) foram avaliados, obtendo-se, respectivamente, faixas lineares de resposta entre 1,0×10⁻⁴ a 2,5×10⁻³ mol L⁻¹ e de 6,0×10⁻⁴ a 1,5×10⁻⁴ mol L⁻¹ de salicilato.

Complexos, envolvendo íons metálicos com diferentes ligantes, tem sido empregados na construção de membranas sólidas visando aumentar a seletividade frente a salicilato. Isto pode ser devido às diferentes estruturas que causam maior ou menor impedimento estérico na interação com o ânion (Shahrokhian et al., 2000). Assim, tem-se os trabalhos de Liu e colaboradores (Liu et al., 1996) que desenvolveram um eletrodo para a dosagem de salicilato em medicamentos e urina. O eletrodo foi preparado pela incorporação de carboxilatos de organo-estanho (IV) em membrana plástica (PVC), obtendo-se faixa de resposta linear entre 0,1×10⁻⁶ a 5,0×10⁻⁶ mol L⁻¹ de salicilato. Li e colaboradores (Li et al., 1995) empregando ftalocianinas de Sn (IV) suportadas em cloreto de polivinila (PVC), obtiveram faixa de resposta entre 10⁻⁵ e 10⁻² mol L⁻¹. Shahrokhian e colaboradores (Shahrokhian et al., 2000) empregando membranas de PVC incorporadas com complexos de alumínio e estanho para a determinação de salicilato em amostras biológicas e farmacêuticas apresentaram respostas numa faixa entre 1×10⁻⁶ a 1×10⁻¹ mol L⁻¹.

Embora o emprego destes eletrodos em análises clínicas de rotina, em muitos casos, ainda não seja possível, são apontadas vantagens para sua utilização em preparações farmacêuticas. Entre os benefícios pode-se citar: especificidade, linearidade da curva de calibração em faixa relativamente ampla (10⁻² a 10⁻⁵ mol L⁻¹), bons limites de detecção (10⁻⁶ a 10⁻⁷ mol L⁻¹), resposta rápida (cerca 30 segundos dependendo da concentração do analito), possibilidade de miniaturização e custo relativamente baixo (Stefan et al., 1997).

Tabela 2.1. Comparação entre alguns eletrodos íon-seletivos para a determinação de salicilato.

Tipo de eletrodo	Coefficiente Angular (mV)	Faixa de Resposta Linear (mol L ⁻¹)	Durabilidade	Referência
Vidro condutor	-55,8	10 ⁻³ a 10 ⁻¹	500 medidas	Pereira et al., 1989
Microeletrodo de fio recoberto	-53,0	10 ⁻³ a 10 ⁻¹	3 semanas	James et al., 1972
Membrana PVC	-56,0	10 ⁻⁴ a 10 ⁻¹	200 medidas	Choi & Fung, 1982
Membrana líquida	-56,0	10 ⁻⁴ a 10 ⁻¹	NF*	Hassan & Hamada, 1988
Membrana PVC	-59,0	10 ⁻³ a 10 ⁻¹	NF	Ishibashi & Matsumoto, 1973
Membrana líquida	-58,0	10 ⁻⁵ a 10 ⁻²	NF	Mitsana-Papazoglou et al., 1984
Membrana PVC	-59,0	10 ⁻⁴ a 10 ⁻¹	NF	Chan et al., 1986
Membrana líquida	-58,0	10 ⁻³ a 10 ⁻¹	NF	Haynes & Wagenkcht, 1971
Tubular/ membrana PVC	-60,0	10 ⁻⁴ a 10 ⁻¹	11 meses	Lima et al., 1990
Tubular/ membrana PVC	-58,3	10 ⁻¹ a 10 ⁻³	3 meses	Rover Jr. et al., 1998
Grafite	-58,66	6x10 ⁻⁴ a 10 ⁻¹	>18 meses	Ferreira et al., 1999

* NF- dados não fornecidos

3.4. Métodos Voltamétricos

Encontram-se, também, métodos voltamétricos para a determinação de salicilato. Relatou-se o emprego da reação de bromação em fluxo contínuo para a dosagem de medicamentos com salicilatos. O bromo é reduzido a brometo por compostos orgânicos (entre eles o ácido acetilsalicílico) com diminuição do potencial medido por eletrodo de carbono vítreo (Fogg et al., 1983). Contudo, esta reação pode sofrer interferências quando se utiliza soro, sangue ou urina, devido à presença de compostos eletroativos com diminuição da seletividade do método, o qual apresentou curvas de calibração lineares na faixa de $1,0 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Além disto, necessita de alta temperatura (70°C) para o desenvolvimento da reação.

Um outro método, utilizando voltametria anódica de pulso diferencial, foi descrito para a dosagem de ácido salicílico em medicamentos e alimentos (Fung & Luk, 1989). Após extração do analito com solventes, as correntes de pico foram medidas empregando-se carbono vítreo. A faixa de trabalho foi de $7,2 \times 10^{-6}$ a $1,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com recuperação média de 99 % e desvio padrão de até 5 %. Os maiores problemas apresentados nesta técnica foram relativos à interferência de alguns compostos presentes nas pomadas, o uso de elevado potencial para as medidas e a necessidade de extração do analito.

Visando à dosagem de salicilato em soro sanguíneo, em níveis de nanogramas, foi desenvolvida uma técnica empregando-se cromatografia líquida com detector voltamétrico (Evans et al., 1991). Foi feita a extração do analito em amostras de soro com clorofórmio e acetonitrila para posterior injeção em coluna de fase reversa. A curva de calibração na faixa de resposta linear para o ácido salicílico foi de $0,03 \times 10^{-9}$ a $1,45 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (4 a 200 ng L⁻¹), no entanto, a recuperação média foi de 60 % com desvio padrão de até 5,8 %. A baixa média de recuperação foi atribuída a possíveis perdas durante a extração, uma vez que se encontravam ao nível de traços.

3.5. Métodos Enzimáticos

De modo geral, os métodos que utilizam reações enzimáticas são rápidos, oferecem especificidade e podem ser realizados diretamente na amostra.

A determinação de salicilato, via reação enzimática, envolve a enzima *salicilato hidroxilase* (salicilato 1-monooxigenase, E.C.1.14.13.1) de acordo com a seguinte equação:

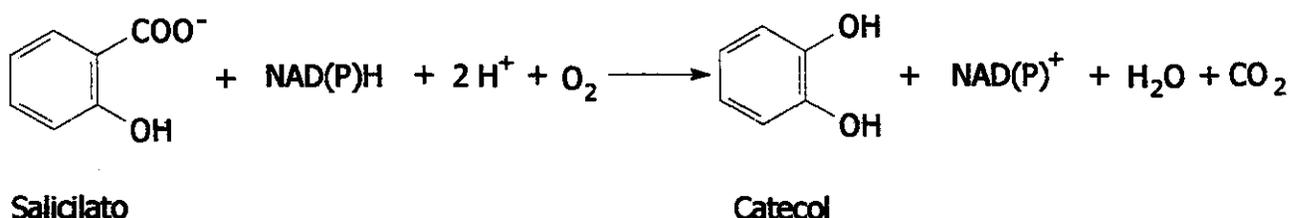


Figura 2.2. Equação da reação catalisada pela enzima *salicilato hidroxilase*.

A *salicilato hidroxilase* promove a conversão de salicilato a catecol pela introdução de um grupamento hidroxila e remoção de um grupamento carboxila utilizando como coenzima NADH ou NADPH. O modelo proposto para o mecanismo da enzima *salicilato hidroxilase* indica que esta é capaz de formar um complexo ternário contendo salicilato e NADH, sendo dependente da concentração de ambos na cinética enzimática. Salicilato e NADH ligam-se aleatoriamente à enzima. A partir daí, ocorre à ligação de oxigênio molecular presente na solução, gerando catecol, gás carbônico e água com regeneração da enzima (White-Stevens et al., 1972; Wang & Tu, 1984). Esta reação prossegue irreversível até o consumo total de um de seus reagentes.

Vários microrganismos têm sido descritos como capazes de produzir a enzima *salicilato hidroxilase*, tais como *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sp.*,

Pseudomonas cepacea e *Trichosporon cutaneum*. A caracterização bioquímica de *salicilato hidroxilase* indicou vários tipos desta enzima, com diferentes massas moleculares médias, estruturas das subunidades e, também, diferentes seletividades para salicilato (Einarsdottir et al., 1988).

Pode-se dividir os métodos enzimáticos para a determinação de ácido acetilsalicílico, em dois grupos: os que utilizam a enzima *salicilato hidroxilase* na forma solúvel e os que a utilizam imobilizada.

3.5.1. Métodos que Utilizam a Enzima na Forma Solúvel

Alguns métodos empregam a enzima *salicilato hidroxilase* diretamente no meio reacional.

Uma forma de determinação de salicilato pode ser feita monitorando-se o decréscimo da absorbância da coenzima por detecção espectrofotométrica, uma vez que a coenzima é consumida durante a reação enzimática (You & Bittikofer, 1984; Longenecker et al., 1984; Banat et al., 1994; Bouvrette & Luong, 1996). O anel piridínico da molécula de NADH, em sua forma reduzida, apresenta absorção máxima a 340 nm e, com o desenvolvimento da reação, há diminuição da absorbância proporcional à concentração de salicilato.

Estas técnicas fundamentadas na absorção de radiação UV pela coenzima apresentam, de modo geral, resposta linear para concentração de salicilato de 10^{-6} a 10^{-4} mol L⁻¹.

A espectrofotometria também foi empregada para determinar salicilato usando o produto da reação enzimática, o catecol. A reação entre catecol e 4-aminofenol em meio básico produz uma espécie colorida monitorada a 565 nm (Chubb et al., 1986) (figura 2.3). O teste apresentou faixa de correlação linear de $1,0 \times 10^{-3}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, com coeficientes de correlação de 0,989 com a técnica

de Trinder e de 0,998 para CLAE. Os níveis de recuperação na presença de vários compostos análogos de salicilato situaram-se entre 93 a 102 %, tendo como principal interferente 4-amino-salicilato com nível de recuperação de 78 %.

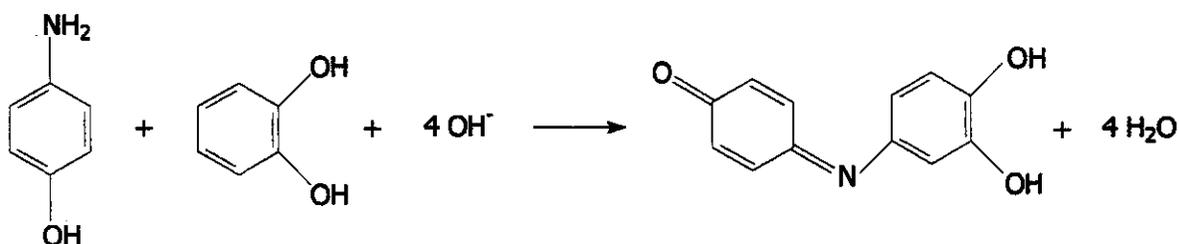


Figura 2.3. Equação da reação entre catecol e 4-aminofenol.

Uma outra alternativa, usando o também o catecol, foi proposta por Morris e colaboradores (Morris et al., 1990). O catecol reage com 4-aminofenazona, sob condições alcalinas, utilizando íons de manganês como catalisador da reação. O método apresentou a mesma faixa de resposta linear para concentração de salicilato que o método logo acima descrito ($1,0 \times 10^{-3}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) com recuperação entre 95 e 105 %. O teste foi comparado com o método de Trinder ($r=0,994$) e com CLAE ($r= 0,993$) tendo apresentado bons níveis de correlação.

Outra forma de determinação de salicilato em soro, usando enzima na forma solúvel, foi apresentada por You (You, 1985), onde o consumo de oxigênio monitorado polarograficamente foi usado para relacionar com a concentração de salicilato. Em comparação com o método de Trinder houve uma boa correlação ($r= 0,99$) com resposta linear entre $0,1 \times 10^{-3}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de salicilato.

Apesar de perfeitamente aplicáveis, estes métodos requerem grande quantidade de enzima liofilizada e purificada. Os ensaios são destrutivos e exigem que a reação enzimática se complete.

3.5.2. Métodos que Utilizam a Enzima na Forma Imobilizada

A imobilização de enzimas, tanto em matrizes artificiais como naturais, pode permitir somar a especificidade enzimática com a possibilidade de reutilização da mesma em diversas análises, obter maior estabilidade e, principalmente, automatizar o procedimento analítico. A imobilização enzimática proporciona o emprego de biossensores e de reatores de enzimas imobilizadas (IMER), que podem funcionar por longos períodos, sem renovação do catalisador. O capítulo IV (Imobilização Enzimática) abordará o assunto mais especificamente.

Atualmente, vários trabalhos empregam a enzima *salicilato hidroxilase* imobilizada em diferentes suportes para a determinação de salicilato e compostos relacionados em diferentes matrizes. Em interessante revisão, Oliveira Neto e colaboradores (Oliveira Neto et al., 1999) abordaram este assunto.

A determinação de salicilato, pelo monitoramento amperométrico do catecol gerado na reação enzimática, tem sido bastante aplicada, usando a enzima *salicilato hidroxilase* imobilizada em diversos suportes. Nesta linha de pesquisa, Neumayr e colaboradores (Neumayr et al., 1993) propõem a detecção de salicilato em fármacos, utilizando um reator o qual contém a enzima imobilizada por ligação covalente, via tetracloroquinona, sobre esferas de vidro (glass beads). O reator foi acoplado a um sistema por injeção em fluxo e o catecol monitorado amperometricamente, com resposta linear na faixa de $3,6 \times 10^{-5}$ a $1,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de salicilato e recuperação entre 93 e 98 %. Em outro artigo semelhante (Neumayr et al., 1995), a enzima *salicilato hidroxilase* foi diretamente imobilizada em eletrodo de platina. Este eletrodo foi usado em sistema de injeção em fluxo para determinação de salicilato em produtos farmacêuticos por de detecção amperométrica do catecol formado, apresentando faixa de resposta linear na faixa de $7,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $4,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e recuperação entre 83 e 104 %.

A detecção amperométrica do catecol gerado na reação enzimática, também foi utilizada em método desenvolvido por Frew e colaboradores (Frew et al., 1989) para dosagem de salicilato em plasma, utilizando-se eletrodo à base de

pasta de carbono. Os reagentes (enzima e coenzima) foram incorporados no eletrodo de trabalho, permitindo determinações, em um minuto, com faixa de resposta linear entre $0,5 \times 10^{-3}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de salicilato.

Ehrendorfer e colaboradores (Ehrendorfer et al., 1996) desenvolveram um sensor onde a enzima *salicilato hidroxilase* foi imobilizada covalentemente sobre eletrodo vitrificado com detecção amperométrica do catecol formado em sistema FIA. A resposta do sensor é linearmente proporcional a concentração de salicilato entre $7,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $7,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, sendo empregado na dosagem de salicilato em bebidas e cosméticos.

O monitoramento amperométrico do catecol gerado também foi utilizado na dosagem de salicilato, em amostras de soro sanguíneo por Zhou e colaboradores (Zhou et al., 1995). O biossensor foi obtido pela imobilização da *salicilato hidroxilase* em eletrodo de pasta de carbono. Uma característica interessante neste trabalho foi o estudo da fermentação para a produção da enzima proveniente de *Pseudomonas putida UUC-1* e sua aplicação na construção do biossensor. A faixa de resposta linear foi de aproximadamente de 0,1 a 1,8 mmol L⁻¹.

Recentemente, Oliveira Neto e colaboradores (Carvalho et al., 2000) também aplicaram a determinação amperométrica de catecol para a dosagem de salicilato em amostras de urina e produtos farmacêuticos. O biossensor desenvolvido envolveu a enzima *salicilato hidroxilase* imobilizada em eletrodo de fibra de carbono e apresentou faixa de resposta linear de $1,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de salicilato. O maior inconveniente é o consumo elevado de NADH, exigindo uma concentração 1000 vezes acima da concentração de salicilato.

Pode-se utilizar também a detecção amperométrica do oxigênio e relacionar o seu consumo com a concentração de salicilato. Neste sentido foi desenvolvido um sensor com a enzima *salicilato hidroxilase* imobilizada, via ligação covalente com glutaraldeído, em membrana de intestino de porco e colocada em contato com o eletrodo de oxigênio (Rahni et al., 1986). Os resultados indicaram uma faixa linear de resposta entre $1,0 \times 10^{-5}$ e $6,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de salicilato, recuperação de 98,7 a 103 % e boa correlação com o método de Trinder ($r = 0,99$).

Semelhante processo foi usado em associação com sistema de injeção em fluxo, no entanto, o sensor empregado foi obtido pela imobilização da enzima por ligação covalente via glutaraldeído em membrana de náilon (Bertocchi et al., 1992). Este sistema apresentou faixa de resposta linear entre $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. O uso de membranas poliméricas de origem natural (Rahni et al., 1986) ou não (Bertocchi et al., 1992), é feito com o intuito de favorecer uma ligação mais efetiva entre a enzima e o suporte, promovendo a estabilidade do material catalítico frente a variações do meio reacional. Os sensores exibiram estabilidade de cerca de 30 dias, com tempos de resposta variando de 2 a 6 minutos, dependendo da concentração de salicilato.

Outra forma de dosagem de salicilato em amostras de soro sanguíneo foi obtida utilizando-se um sensor potenciométrico. A enzima foi imobilizada fisicamente junto a uma membrana de diálise, sobre a superfície de um sensor para dióxido de carbono. O dióxido de carbono formado pela reação enzimática foi monitorado e, assim, relacionado com a concentração de salicilato (Fonong & Rechnitz, 1984). A faixa de resposta linear do método foi de $3,7 \times 10^{-5}$ a $2,2 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$. Embora este sensor tenha apresentado boa seletividade nos ensaios, em função da membrana de diálise, apresentou elevado tempo de resposta (5 a 10 minutos).

Mais recentemente, com o desenvolvimento de mediadores de elétrons e novos suportes a base de polímeros condutores, Oliveira Neto e colaboradores (Milagres et al., 1997) desenvolveram um sensor onde a enzima *salicilato hidroxilase* foi imobilizada, via glutaraldeído, sobre filme polipirrol dopado com hexacianoferrato e fixada em eletrodo de carbono vítreo. Fez-se a detecção amperométrica do catecol para análise de medicamentos em sistema de injeção em fluxo. Os autores obtiveram uma elevada sensibilidade para salicilato com respostas na faixa de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{mol L}^{-1}$. Podemos citar também, o sensor para salicilato desenvolvido por Kubota e colaboradores (Kubota et al., 1996), imobilizando a enzima *salicilato hidroxilase* em eletrodo de pasta de carbono contendo azul de Meldola como mediador. Este reator detecta o catecol produzido

na reação enzimática através da eletrooxidação do mediador, com resposta amperométrica na faixa de $1,0 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Oliveira Neto e colaboradores (Rover Jr. et al., 2000), na mesma linha de trabalho, propuseram o desenvolvimento de um biossensor visando determinação amperométrica de salicilato através do monitoramento de catecol produzido na reação enzimática. Como mediador de elétrons foi usado hexacianoferrato, incorporado no filme de polipirrol juntamente com a enzima e glutaraldeído, sobre a superfície de carbono vítreo. A faixa de resposta linear foi de $2,3 \times 10^{-6}$ a $1,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com estudos de recuperação entre 96,4 a 104,8%. A principal vantagem em comparação aos biossensores anteriores descritos foi o aumento do tempo de vida. Nestes casos, o eletrodo manteve-se estável por cerca de 40 dias. Nos dois casos anteriores os eletrodos apresentaram estabilidade de 20 dias (Kubota et al., 1996) e 10 dias (Milagres et al., 1997).

Uma outra opção tem sido o desenvolvimento de sensores envolvendo sistemas com duas enzimas. Moore e colaboradores (Morre et al., 1995) propuseram determinação voltamétrica de salicilato através de método que envolveu o uso da *salicilato hidroxilase* imobilizada em eletrodo de carbono. Esta enzima converte salicilato a catecol que por sua vez, é oxidado via eletroquímica para orto-quinona. Esta substância é então reduzida pela enzima glicose oxidase regenerando o catecol. A reoxidação do catecol resulta em um sinal de corrente amplificada. A faixa de resposta linear para concentrações de salicilato em amostras de soro foi de $1,0 \times 10^{-4}$ a $6,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Mais recentemente, Martin & Domínguez (Martin & Domínguez, 1999), desenvolveram um sensor amperométrico contendo *salicilato hidroxilase* e tirosinase em sistema de injeção em fluxo. A enzima *salicilato hidroxilase* catalisa a hidroxilação de salicilato a catecol e a tirosinase oxida o catecol gerado a orto-quinona, sendo esta reduzida eletroquimicamente a catecol novamente. Este ciclo de oxidação e redução resulta em amplificação de sinal permitindo limites de detecção mais baixos. O sensor desenvolvido obteve limite de detecção de $3,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

A imobilização da *salicilato hidroxilase* em sensores de fibras ópticas também tem sido estudada para a determinação de salicilato. A dosagem deste composto baseia-se no monitoramento do gás carbônico formado na reação (Sotomayor, 2000). A imobilização química através de ligação covalente empregando silanização foi considerada a mais adequada, com resposta linear na faixa de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Capítulo III

Enzimas

1. Introdução

A utilização de reações enzimáticas pelo homem se confunde com os primórdios da civilização. Inicialmente o emprego de enzimas ocorreu exclusivamente de forma empírica, para mais tarde tornar-se de grande importância em uma vasta gama de aplicações industriais. Nas últimas décadas, em função de sua elevada especificidade, passou a ser explorada de forma cada vez mais intensa em diversas áreas da ciência (Lima e Angnes, 1999).

O nome enzima ("no levedo") foi somente usado em 1877, porém já se suspeitava que estes catalisadores especiais participavam da fermentação do açúcar para formar o álcool (de onde vem o nome inicial "fermentos") (Lehninger, 1993).

As enzimas podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbianas. Entretanto, a partir do momento que o desenvolvimento da microbiologia permitiu compreender melhor os sistemas que presidem a síntese das enzimas nos microrganismos, a produção industrial de enzimas baseou-se em processos de fermentação. As principais vantagens das enzimas obtidas por fermentação sobre as enzimas obtidas por extração são: produção independente de variações climáticas e geográficas, possibilidade de otimização dos processos de produção e redução de custos (Scriban, 1985; Price et al., 1995).

As enzimas são catalisadores orgânicos produzidos por células vivas que intervêm em reações biológicas acelerando-as por ativação específica. Uma vez elaborada por uma célula, uma enzima poderá atuar independente desta, se condições apropriadas forem mantidas. As enzimas permitem atingir rapidamente o

estado de equilíbrio da reação sem modificá-lo. As características mais impressionantes das enzimas são seu elevado poder catalítico e sua especificidade (Lehninger, 1993).

Quase todas as enzimas conhecidas são proteínas que pertencem à classe das proteínas globulares. Contudo, a descoberta de moléculas de RNA (ácido ribonucléico) cataliticamente ativas indicaram que as proteínas não têm um monopólio absoluto da catálise (Soares & Lins, 1995).

As enzimas aceleram as reações, reduzindo a energia livre de ativação de reações químicas fornecendo uma nova via de reação, na qual o estado de transição tem uma energia mais baixa e, desta forma, é mais acessível do que na reação não catalisada. Sua ação seletiva, sobre a cinética de reação, promove um decréscimo da energia de ativação, o que vai acelerar a reação cuja velocidade pode ser multiplicada por fatores de, pelo menos, 10^6 (Stryer, 1994).

Uma das características mais importantes da catálise enzimática reside na sua especificidade, muito mais marcante do que a catálise química. Esta especificidade apresenta um duplo aspecto: especificidade quanto à reação e especificidade quanto ao substrato. A enzima só pode catalisar um dado tipo de reação e toda reação enzimática implica na fixação do substrato em pontos precisos da enzima. Estas regiões específicas da enzima são chamadas de centros ativos, ou sítios ativos. A maioria das enzimas é altamente seletiva na sua ligação a substratos (Stryer, 1994). Estas características de especificidade são em função da conformação da molécula enzimática, da singularidade de seu sítio ativo e também da estrutura da molécula de substrato. A seletividade das enzimas é baseada, portanto, nas diferenças entre grupamentos químicos, ligações químicas ou estereoisômeros (Marko-Vargo & Dominguez, 1991). Embora a maioria das enzimas envolvidas nas atividades metabólicas vitais tenha sido identificada, muitas questões permanecem sem solução. Estudos têm sido realizados visando descobrir como as enzimas catalisam as reações químicas com eficiência, precisão e especificidade elevada (Lehninger, 1993).

Uma classificação sistemática das enzimas foi adotada pela "Enzyme Commission", com o objetivo de identificar, caracterizar e nomear de modo a permitir

uma designação para cada enzima de forma a fornecer a maior quantidade de informações de maneira precisa. O sistema divide as enzimas em 6 principais classes e subclasses dependendo da natureza da reação catalisada. Para cada enzima é indicado um nome "comum" para uso diário, um nome sistemático para identificar a reação catalisada e um número de classificação, que identifica sem ambigüidades uma enzima. Este número comporta quatro algarismos, separados por pontos, precedidos pela sigla EC ("Enzyme Commission"). O primeiro algarismo indica o nome da classe à qual pertence à enzima, o segundo e o terceiro indicam as subclasses e o quarto algarismo é o número de série (indica mais precisamente a maneira pela qual a ligação específica é rompida) (Lehninger, 1993; Scriban, 1985).

2. Cinética enzimática

O estudo da cinética enzimática visa estabelecer relações existentes entre a velocidade da reação enzimática e as concentrações de substrato e enzima, e os fatores de influência tais como: pH, temperatura, presença de substâncias consideradas ativadoras ou inibidoras.

Para muitas enzimas, com uma concentração fixa de enzima, a velocidade de catálise varia com a concentração de substrato, segundo uma curva hiperbólica como ilustrado na figura 3.1. Em baixas concentrações de substrato, o sítio ativo das moléculas da enzima não está saturado pelo substrato e assim, a velocidade varia com a concentração de substrato. Com o aumento de moléculas de substrato os sítios ativos são cobertos, até que, nenhum sítio será disponível e a velocidade será independente da concentração de substrato. Leonor Michaelis e Maud Menten, no começo do século XX, propuseram a teoria geral da ação enzimática para sistemas com um único substrato para explicar estas características cinéticas.

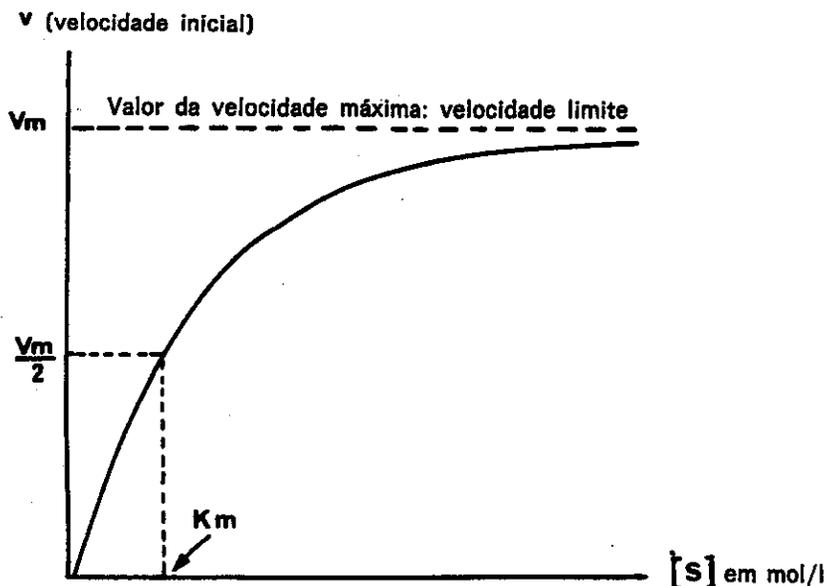
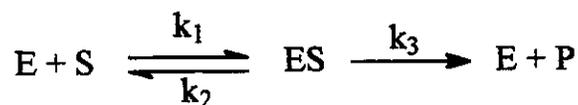


Figura 3.1. Gráfico da velocidade de reação, V , em função da concentração de substrato em mol L^{-1} , $[S]$, para uma enzima que obedece à cinética de Michaelis-Menten.

Uma reação típica catalisada por enzima envolve a formação de um complexo intermediário transitório, ES , com uma constante de velocidade k_1 . Este complexo resulta de uma interação de estrutura entre o sítio ativo da enzima e a molécula de substrato. O complexo enzima/substrato tem dois destinos possíveis. Ele pode dissociar-se em enzima e substrato, com uma constante de velocidade k_2 , ou pode prosseguir para formar produto, com uma constante de velocidade k_3 como na equação (1) abaixo:



- Onde: E = enzima;
 S = substrato;
 ES = complexo enzima substrato;
 P = produto;
 k_1, k_2, k_3 = constantes de velocidades

No início da reação, a concentração de produto é muito baixa, podendo então ser desprezada, do mesmo modo, que a transformação do produto em substrato.

Assim a velocidade de catálise será igual ao produto da concentração do complexo enzima/substrato por k_3 , onde tem-se:

$$(2) \quad V = k_3 [ES]$$

Para expressar a concentração de complexo em termos de quantidade, as taxas de formação e quebra do complexo ES são dadas por:

$$(3) \text{ Velocidade de formação de } ES = k_1 [E] [S]$$

$$(4) \text{ Velocidade de dissociação de } ES = (k_2 + k_3) [ES]$$

Em um estado estacionário, a concentração do intermediário permanece a mesma, enquanto as dos materiais iniciantes e dos produtos estão mudando. Isto ocorre quando as velocidades de formação e dissociação do complexo ES são iguais. Igualando-se as equações 3 e 4 tem-se:

$$(5) \quad k_1 [E] [S] = (k_2 + k_3) [ES]$$

Rearranjando a equação acima (5),

$$(6) \quad [ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 + k_3) / k_1}$$

A equação pode ser simplificada, definindo-se uma nova constante, K_m , chamada de constante de Michaelis,

$$(7) \quad K_m = k_2 + k_3 / k_1$$

Aplicando-se na equação 6,

$$(8) \quad [ES] = [E] [S] / K_m$$

Pode-se considerar, também, que a concentração de substrato não combinado [S] é quase igual à concentração de substrato total, desde que a concentração da enzima seja bem menor do que a do substrato. A concentração de enzima não combinada [E] é igual à concentração da enzima total [E_T] menos a concentração do complexo [ES].

$$(9) [E] = [E_T] - [ES]$$

Aplicando-se esta expressão na equação 8,

$$(10) [ES] = ([E_T] - [ES]) [S] / K_m$$

Resolvendo a equação 9 para [ES],

$$(11) [ES] = [E_T] \frac{[S] / K_m}{1 + [S] / K_m}$$

OU

$$[ES] = [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Aplicando-se esta expressão para [ES] na equação 2,

$$(12) V = k_3 [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

A velocidade máxima (V_{max}) é obtida quando os sítios ativos da molécula de enzima estão saturados do substrato. Nesta situação, pode-se considerar que a concentração de substrato é muito maior do que K_m, de tal forma que [S] / ([S] + K_m) se aproxima de 1. Assim,

$$(13) V_{max} = k_3 [E_T]$$

Aplicando-se a equação 14 na equação 13, obtém-se a equação de Michaelis-Menten, que explica o comportamento difásico da reação enzimática.

$$(14) V = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Esta equação explica o gráfico da figura 3.1. Quando a concentração de substrato é muito menor que K_m , $V = [S] V_{max} / K_m$, ou seja, a velocidade é diretamente proporcional à concentração do substrato. Em concentrações elevadas de substrato a velocidade é máxima independentemente da concentração do substrato. Quando $[S] = K_m$, então $V = V_{max} / 2$. Assim, o valor de K_m é igual à concentração do substrato na qual a velocidade de reação é metade da sua velocidade máxima. Este valor pode ser considerado como inversamente proporcional à afinidade da enzima pelo substrato. Quanto menor seu valor, maior será a afinidade e vice-versa.

Pode-se usar transformações da equação de Michaelis-Menten, de modo a obter-se um gráfico em linha reta. A mais empregada delas, talvez, seja a chamada equação recíproca de Lineweaver-Burk, sendo feita tomando-se a recíproca de ambos os lados da equação (14).

$$(15) \quad \frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$$

Um gráfico $1 / V$ versus $1 / [S]$, fornece uma linha reta, com um intercepto de $1 / V_{max}$ no eixo de $1 / V$ e uma inclinação de K_m / V_{max} como pode ser visualizado na figura 3.2 (Stryer, 1994).

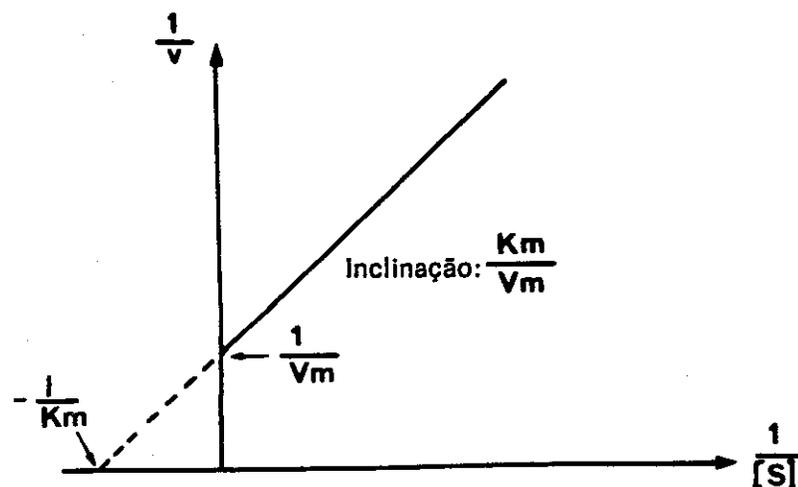


Figura 3.2. Linearização da equação de Michaelis-Menten segundo Lineweaver-Burk.

2.1. Atividade Enzimática

A atividade de uma enzima é função direta da sua estrutura terciária e quaternária. Assim, todo tratamento que modifique sua conformação, como aquecimento, alteração do pH do meio e outros, dificultando ou impedindo a fixação do substrato na enzima ou ainda, alterando a estrutura do sítio ativo, alterará as propriedades catalíticas da enzima e, portanto seu funcionamento (Scriban, 1985).

A unidade de atividade enzimática (U) é definida pela quantidade de enzima que irá catalisar a transformação de 1 μmol de substrato por minuto em condições ótimas de pH e temperatura adequadas para cada enzima.

Outras definições também têm sido usadas. A "Enzyme Commission" definiu uma nova unidade internacional da atividade enzimática denominada katal (kat), sendo esta definida como a quantidade de enzima que transforma um mol de substrato por segundo, sob condições experimentais estabelecidas. Submúltiplos são também empregados: mili (mkat) microkatal (μkatal), nano (nkat). Embora o katal seja uma unidade recomendada pelo Sistema Internacional de Unidades não é, freqüentemente usada.

Outras expressões empregadas para atividade enzimática são (Lehninger, 1993):

- *Atividade específica* – definida como unidades de enzima por miligrama de proteína.
- *Atividade do centro catalítico* – expressa como número de moléculas do substrato transformadas por minuto por centro catalítico.
- *Atividade molar ou molecular* – estabelecido como número de moléculas de substrato transformadas, por minuto, por uma única molécula enzimática.

2.2. Fatores de Influência

A atividade de uma enzima e conseqüentemente a velocidade de reação pode ser modificada pela presença de outros compostos, que não seja o substrato. Eles

desempenham um importante papel na atividade enzimática e podem ser úteis no estudo dos mecanismos de ação de muitas enzimas. Pode-se classificar estes compostos em duas classes:

- ativadores - aqueles que aumentam a velocidade da reação
- inibidores e inativadores - aqueles que reduzem a velocidade de reação.

Entretanto, convém lembrar que esta distinção não é rigorosa, pois uma mesma substância, segundo a concentração e condições do meio pode ter características ativadoras ou inibidoras. Como exemplo desta afirmação pode-se citar a ação de alguns íons metálicos que podem agir como ativadores ou inibidores.

Duas classes gerais de inibidores são reconhecidas, e suas ações envolvem inibição reversível ou irreversível. Os três tipos principais de inibição reversível são o competitivo, incompetitivo e não competitivo (Scriban, 1985).

2.2.1. Cofatores

Um grande número de enzimas exige um componente adicional para exercer sua função catalítica. Estes componentes chamados cofatores são substâncias aprotéicas que atuam em associação com certas enzimas e que, em muitos casos, desempenham papel relevante na catálise. Os cofatores são geralmente estáveis a variações de temperatura e podem ser classificados em coenzimas, grupos prostéticos e íons metálicos, como esquematizado na figura 3.3.

Os grupos prostéticos são substâncias de massa molecular bem menor do que a da molécula enzimática, sendo ligados firmemente à proteína enzimática. Como exemplo da presença de grupo prostético, pode-se citar a glicose oxidase, que tem duas moléculas de flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) por molécula de enzima.

As coenzimas são moléculas orgânicas que, normalmente, encontram-se livres em solução e que, ao se ligarem à molécula enzimática, favorecem a catálise.

As coenzimas funcionam, usualmente, como transportadores intermediários de grupos funcionais, de átomos específicos ou de elétrons transferidos na reação

enzimática global. Exemplos típicos são: nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADPH/ NADP⁺), nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADH/ NAD⁺), pirofosfato de tiamina, entre outros.

Os íons metálicos, representados por cátions metálicos mono ou divalentes como K⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ são indispensáveis para a atividade de uma série de enzimas, sendo conhecidas como metaloenzimas. Estes podem estar firmemente ligados ou em solução. Quando estes cofatores de natureza inorgânica, em solução, são capazes de ativar certas enzimas são denominados ativadores (Lehninger, 1993; Conn & Stumpf, 1985).

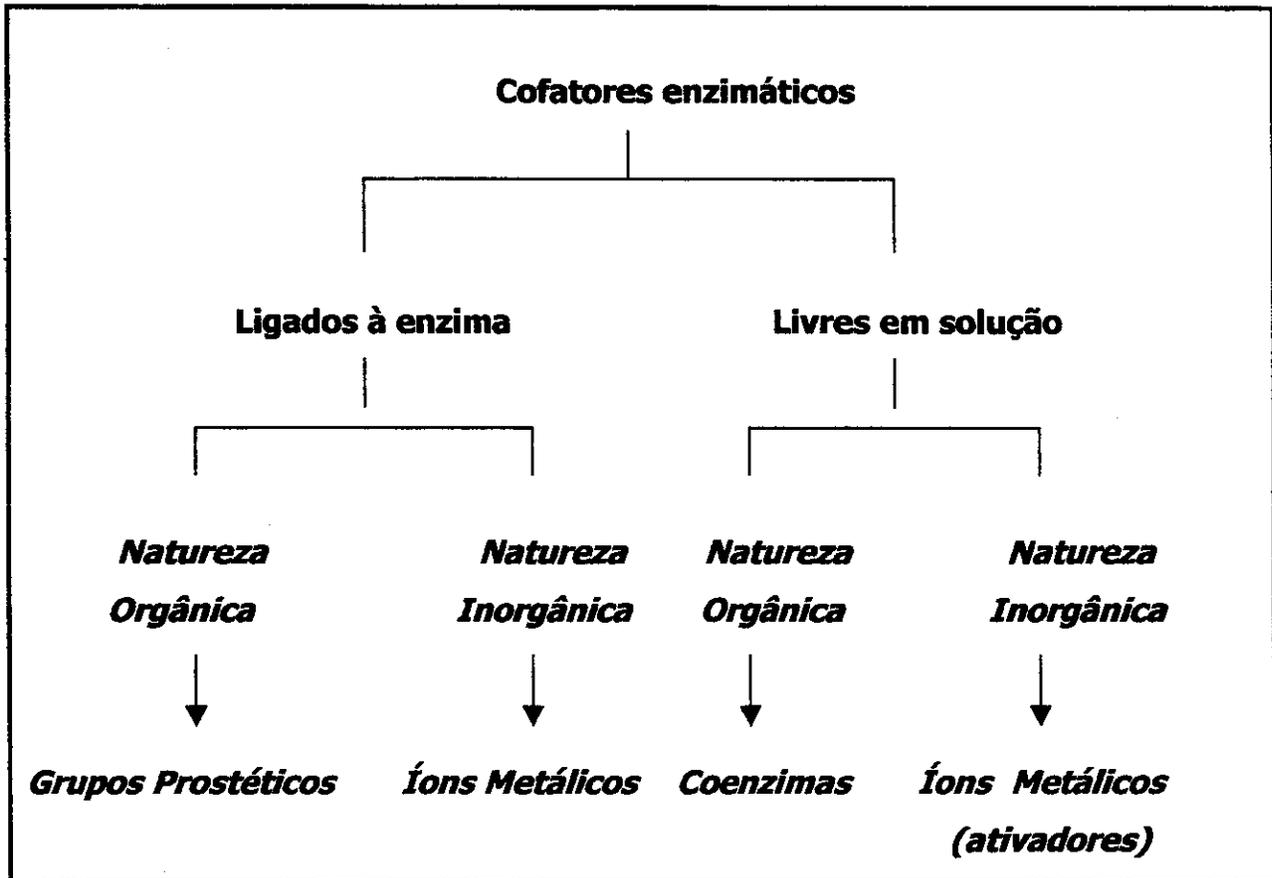


Figura 3.3. Classificação de cofatores enzimáticos.

2.2.2. Inibição Competitiva

O inibidor é uma substância de estrutura química e espacial análoga ao substrato e que se instala no sítio ativo da enzima impedindo a fixação do substrato. Um inibidor competitivo reage reversivelmente com a enzima para formar um complexo enzima-inibidor (EI), semelhante ao complexo enzima-substrato:



A molécula do inibidor não é quimicamente alterada pela enzima, sendo definida uma constante do inibidor k_i , definida por:

$$k_i = [E] [I] / [EI]$$

A velocidade máxima inicial da reação não é modificada pela presença do inibidor, o que significa que a competição substrato/inibidor pelo sítio ativo da enzima é favorável ao substrato, desde que este esteja em maior concentração.

2.2.3. Inibição Incompetitiva

A inibição incompetitiva, caracteriza-se pelo fato do inibidor não se combinar com a enzima livre, nem afetar sua reação com seu substrato normal. Trata-se de uma inibição por bloqueio do complexo ES. Ocorre a formação de um complexo inativo enzima-substrato-inibidor, ESI, incapaz de sofrer a etapa subsequente da reação originando os produtos:



A constante do inibidor é dada por:

$$k_I = [ES] [I] / [ESI]$$

A inibição incompetitiva é rara em reações de um substrato, mas comum em reações contendo dois ou mais substratos.

2.2.4. Inibição Não-Competitiva

O inibidor liga-se indiferentemente à enzima ou ao complexo enzima-substrato, interferindo na ação de ambos. Os inibidores não-competitivos ligam-se a um sítio da enzima diferente do sítio ativo, muitas vezes promovendo deformação da mesma, de modo que ela não forme o complexo na velocidade usual e uma vez formado, não se desdobre na velocidade esperada para originar os produtos. Esses efeitos não são revertidos pelo aumento da concentração de substrato, na inibição não-competitiva, a reação com o inibidor provoca duas formas inativas, EI e ESI:



Com duas constantes de inibição: $k_1^{EI} = [EI] [I] / [EI]$

$$k_1^{ESI} = [ES] [I] / [ESI]$$

2.3. Fatores Ambientais de Influência

As condições do ambiente reacional também afetam profundamente a atividade catalítica de uma molécula enzimática. Dentre os fatores ambientais de maior importância pode-se citar: pH, temperatura, teor de água, solvente e radiações.

2.3.1. pH

As enzimas são sensíveis às variações hidrogeniônicas do meio, existindo uma faixa de pH ótimo, na qual têm atividade máxima, sendo esta determinada experimentalmente para cada condição de trabalho.

Sendo quase em sua maioria proteínas, mudanças de pH afetam o caráter iônico dos aminogrupos e dos grupos carboxílicos da proteína agindo, portanto, no sítio catalítico e na conformação da enzima. Além dos efeitos puramente iônicos, valores baixos ou altos de pH podem causar desnaturação com conseqüente inativação. Além disto, muitos substratos têm caráter iônico, que também podem ser afetados pelo pH do meio, e o sítio ativo da enzima pode exigir espécies iônicas determinadas para a formação do complexo enzima/substrato. Provavelmente, estes são os fatores determinantes de uma típica relação atividade enzimática / pH.

O pH ótimo de uma enzima não é necessariamente idêntico ao pH de seu meio intracelular normal, isto sugere que esta relação pode ser um fator de controle intracelular da atividade da enzima (Lehninger, 1993; Conn & Stumpf, 1985).

2.3.2. Temperatura

Existe uma faixa de temperatura, às vezes estreita, onde a atividade enzimática é máxima para um determinado conjunto de condições experimentais. A variação da atividade enzimática em função da temperatura resulta de dois efeitos antagônicos: de um lado o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura, que aumenta o choque entre as moléculas, levando a um aumento na velocidade de reação; de outro, o valor crescente de desnaturação térmica da enzima para temperaturas acima de um valor considerado crítico (Stryer, 1994). O efeito predominante de aumento da velocidade de reação, de modo geral, ocorre até cerca de 45°C. A partir daí, um fator oposto, ou seja, a desnaturação térmica se tornará

mais importante, até que, a 55°C, rápida desnaturação destruirá a função catalítica da molécula enzimática. Entretanto algumas enzimas são capazes de manter atividade em temperaturas mais elevadas, como por exemplo, enzimas de várias espécies de bactérias termofílicas que habitam fontes de água quente suportando temperaturas da ordem de 85°C (Lehninger, 1993; Conn & Stumpf, 1985).

2.3.3. Teor de Água

A molécula de água e os íons oriundos de sua auto-ionização, H^+ e OH^- , influenciam profundamente a estrutura, a automontagem e as propriedades das enzimas. Biomoléculas como as enzimas são anfipáticas, possuindo regiões superficiais polares e não-polares. Em um ambiente aquoso, essas duas regiões experimentam tendências conflitantes. Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos agregam-se para apresentar a menor área hidrofóbica possível à água (ficam confinadas no interior da molécula protéica) e as regiões polares são arranjadas para maximizar as interações. Assim, alguns autores afirmam que a atividade enzimática está relacionada com a atividade da água, independentemente do solvente utilizado, e que a quantidade de água necessária para a catálise depende das características de cada enzima (Lima & Angnes, 1999).

A maioria das reações enzimáticas desenvolve-se em meio aquoso. Entretanto, é comum observar que alimentos desidratados sofrem, apesar do baixo teor de água, degradações enzimáticas que conduzem ao aparecimento de odor ou de gosto desagradáveis. Em tais casos, o papel de solvente da enzima, habitualmente desempenhado pela água é secundário. As lipases que funcionam em baixíssima atividade de água, ilustram este tipo de comportamento (Scriban, 1985).

2.3.4. Radiações

As radiações do tipo eletromagnético ou corpuscular podem ter sobre as enzimas uma ação desnaturante. As radiações podem exercer uma ação direta provocando rupturas de ligações com desaminação e descarboxilação dos resíduos de aminoácidos ou ruptura de ligações peptídicas. Podem exercer, também, uma ação indireta, modificando as características do meio, como a elevação da temperatura sob ação do infravermelho ou microondas e variações de pH sob radiações ionizantes.

Para se obter inativação total das enzimas é necessário aplicar doses elevadas (80 a 100 kgrey), superiores às doses que permitem obter uma esterilização ou radapertização (4 a 6 Mrad). Essa propriedade permite utilizar radiações para esterilizar preparações enzimáticas ou ainda acelerar certas reações de polimerização na preparação de enzimas imobilizadas (Scriban, 1985).

Capítulo IV

Imobilização Enzimática

1. Introdução

A grande especificidade de ação das enzimas e as condições muito brandas nas quais elas funcionam, conferem-lhes certas vantagens sobre os catalisadores comuns. Em vista disto, o uso de preparações enzimáticas desenvolveu-se em diversos setores como nas indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias, para usos terapêuticos, aplicações analíticas, etc. Como reagente analítico, as enzimas têm sido usadas por muitas décadas, talvez, o primeiro registro, visando a determinação de um analito comum, ocorreu em 1928 na análise de glicose (Price et al., 1995).

O uso de enzimas com propósitos analíticos, empregando-as em soluções apresenta, de modo geral, algumas desvantagens que limitam sua aplicação, como altos custos para extração e purificação, instabilidade em soluções, baixa precisão e sua não recuperação. Entretanto, o desenvolvimento de tecnologias para a imobilização ou insolubilização de enzimas, impulsionou o uso deste material biológico como reagente analítico (Lima & Angnes, 1999).

Já em 1916, Nelson e Griffin (Scriban, 1985) demonstraram que a invertase adsorvida em carvão ativado conservava sua atividade catalítica. Entretanto, uma das primeiras aplicações analíticas tendo uma enzima imobilizada foi realizada somente em 1951, para a determinação de uréia empregando-se urease. A partir daí, as pesquisas se intensificaram e, em 1962, Clark e Lyons desenvolveram uma nova geração de captadores eletroquímicos, os chamados eletrodos de enzima. Este sensor

empregou glicose oxidase fisicamente imobilizada em uma membrana de cuprofane (celulose modificada) integrada a um eletrodo de oxigênio. O princípio repousa no acoplamento de uma reação enzimática tendo a detecção realizada por um eletrodo específico, que detecta o aparecimento de um produto da reação enzimática ou o desaparecimento de um substrato. O eletrodo de glicose desenvolvido permitiu a dosagem seletiva da glicose por medida polarográfica da concentração em O_2 . Mais tarde, Updike e Hicks em 1967 aperfeiçoaram este modelo pela imobilização da glicose oxidase em gelatina. (Scriban, 1985; Fatibello & Capelato, 1992).

A imobilização ou insolubilização de enzimas permitiu popularizar os métodos enzimáticos em química analítica, pois a reutilização das mesmas em muitas análises possibilitou baixar os custos. Somam-se a isto, inúmeras outras vantagens, podendo-se citar (Lima & Angnes, 1999):

- Processos químicos podem ser continuamente operados.
- Possibilidade do uso de vários transdutores.
- Melhoria de rendimento por unidade de enzima.
- Aumento da reprodutibilidade do procedimento analítico.

A forma imobilizada de uma enzima pode ser apresentada, de acordo com o uso, em três formas distintas (Worsfold, 1995):

- Reatores com a enzima imobilizada em fase sólida, para o emprego em sistemas de análises em fluxo ou em cromatografia líquida.
- Membranas com a enzima imobilizada incorporada em sensores como eletrodos enzimáticos potenciométricos ou sensores ópticos.
- Filmes com a enzima imobilizada em fase sólida sobre dispositivos para uso com conjunto de reagentes, principalmente para análises clínicas.

2. Propriedades

Os efeitos da imobilização sobre a atividade da enzima resultam da interação de diferentes elementos, tais como a modificação da estrutura tridimensional da enzima sob a ação de imposições devidas à fixação, modificações do microambiente (pH, interações eletrostáticas) e impedimento estérico. Juntos estes fatores representam um papel determinante na atividade e estabilidade da enzima imobilizada (Scriban, 1985).

A fixação em suporte realiza um modelo próximo das condições da célula viva, onde as enzimas encontram-se, freqüentemente, ligadas à membrana ou a organelas intramoleculares. Deste modo, geralmente, a imobilização promove um aumento do tempo de sobrevivência sobre condições desnaturantes. As condições de pH e de temperatura necessárias à reação podem provocar a desnaturação parcial ou total da molécula enzimática. Mas, uma vez realizada a imobilização, observa-se, em muitos casos, que estas resistem melhor às variações de pH e temperatura (Scriban, 1985; Fágáin & O’Kennedy, 1991). Entretanto, em alguns casos, pode provocar decréscimo da atividade em consequência da menor flexibilidade espacial das enzimas (Gorton et al., 1994).

Em relação à temperatura, as enzimas imobilizadas, de modo geral, apresentam incremento de sua termoestabilidade comparada com sua forma nativa. Este aumento é atribuído à rigidez da molécula protéica quando esta é imobilizada (Fágáin & O’Kennedy, 1991).

Pode ocorrer também uma defasagem do valor de pH ótimo para a atividade enzimática. Tal fenômeno poderá ser explicado quando o suporte comportar numerosos grupos ionizados. Em alguns casos o pH ótimo da enzima imobilizada é o mesmo que o da forma nativa, mas o perfil da curva se alargará (Scriban, 1985; Worsfold, 1995).

Além do mais, a estabilidade de uma enzima imobilizada depende não somente da enzima em si e do processo de imobilização, mas das características do suporte e também do tipo de amostra a ser analisada, a qual poderá conter diferentes substâncias ativadoras ou inibidoras (Gorton et al., 1994).

3. Características dos Suportes

O material empregado como suporte, com já dito, influencia a eficiência da imobilização e a estabilidade do sensor. Embora não haja um suporte universal, pois a escolha deverá envolver um compromisso entre a enzima em particular e o sistema experimental, são requisitos essenciais: ser insolúvel em água, ter capacidade de ligação com a enzima, ser quimicamente inerte e mecanicamente estável. Os tipos de suporte podem ser convenientemente classificados em três categorias (Worsfold, 1995):

- Biopolímeros hidrofílicos originados de polissacarídeos naturais, como: agarose, dextran e celulose.
- Polímeros lipofílicos sintéticos, tais como poliacrilamida, poliestireno e náilon.
- Materiais inorgânicos, como vidro de porosidade controlada e óxido de ferro.

Uma escolha bastante freqüente recai nas esferas de vidro de porosidade controlada, devido a sua grande área de superfície. As maiores desvantagens são a estreita margem de trabalho em relação ao pH e a não homogeneidade da superfície e de sua forma (Marko-Varga & Domínguez, 1991).

4. Técnicas de Imobilização

A atividade das enzimas está ligada à manutenção da integridade de sua conformação terciária, em particular ao nível de seu sítio ativo. Assim, os processos de imobilização devem fazer uso de métodos brandos e bem controlados, respeitando-se a estrutura nativa da proteína. Vários processos de imobilização do material biológico são descritos na literatura e, de modo geral, podem ser incluídos nas seguintes categorias: inclusão ou oclusão em matriz, microencapsulação, fixação por adsorção, fixação por ligação covalente e fixação por ligação covalente cruzada (Alvarez-Icasa & Bilitewski, 1993; Fatibello Filho & Capelato, 1992; Oliveira Neto & Yamanaka, 1988). As figuras 4.1 e 4.2 ilustram essas categorias de imobilização.

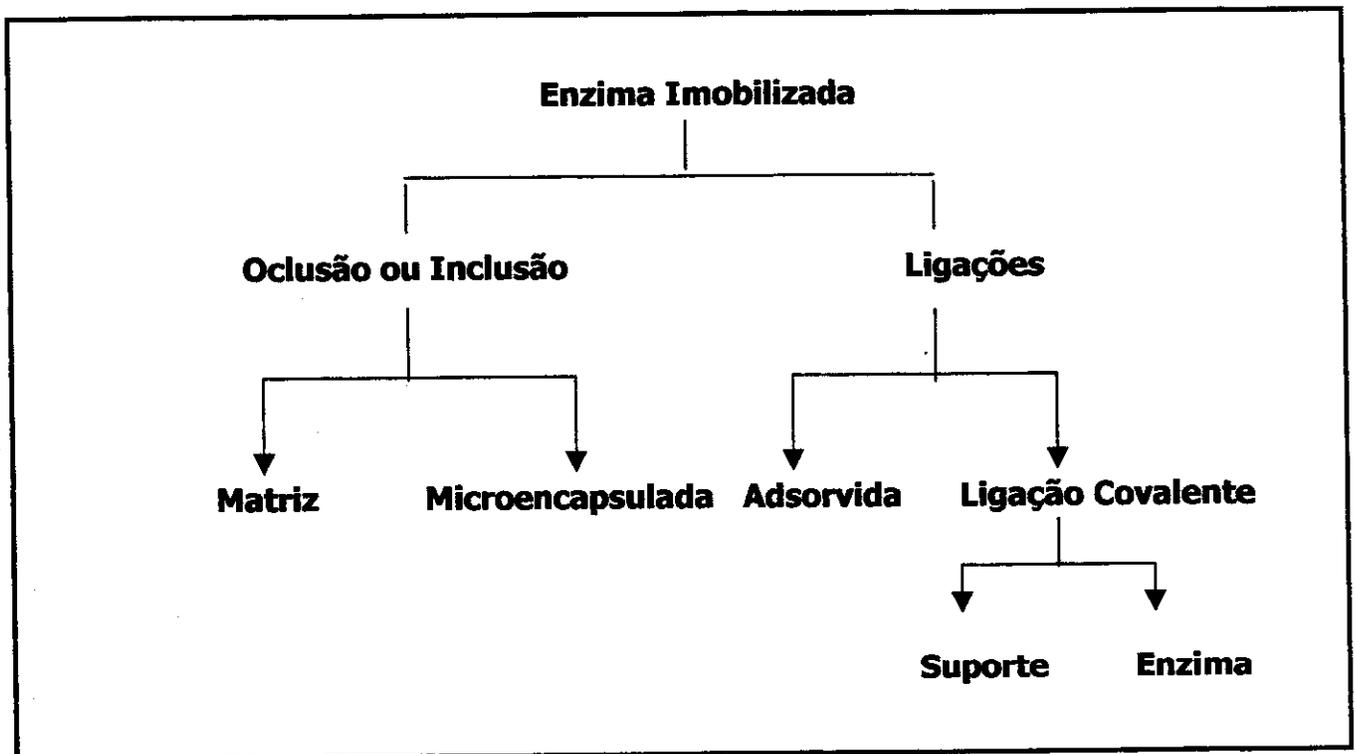


Figura 4.1. Formas de imobilização enzimática. Fonte: Fatibello & Capelato, 1992.

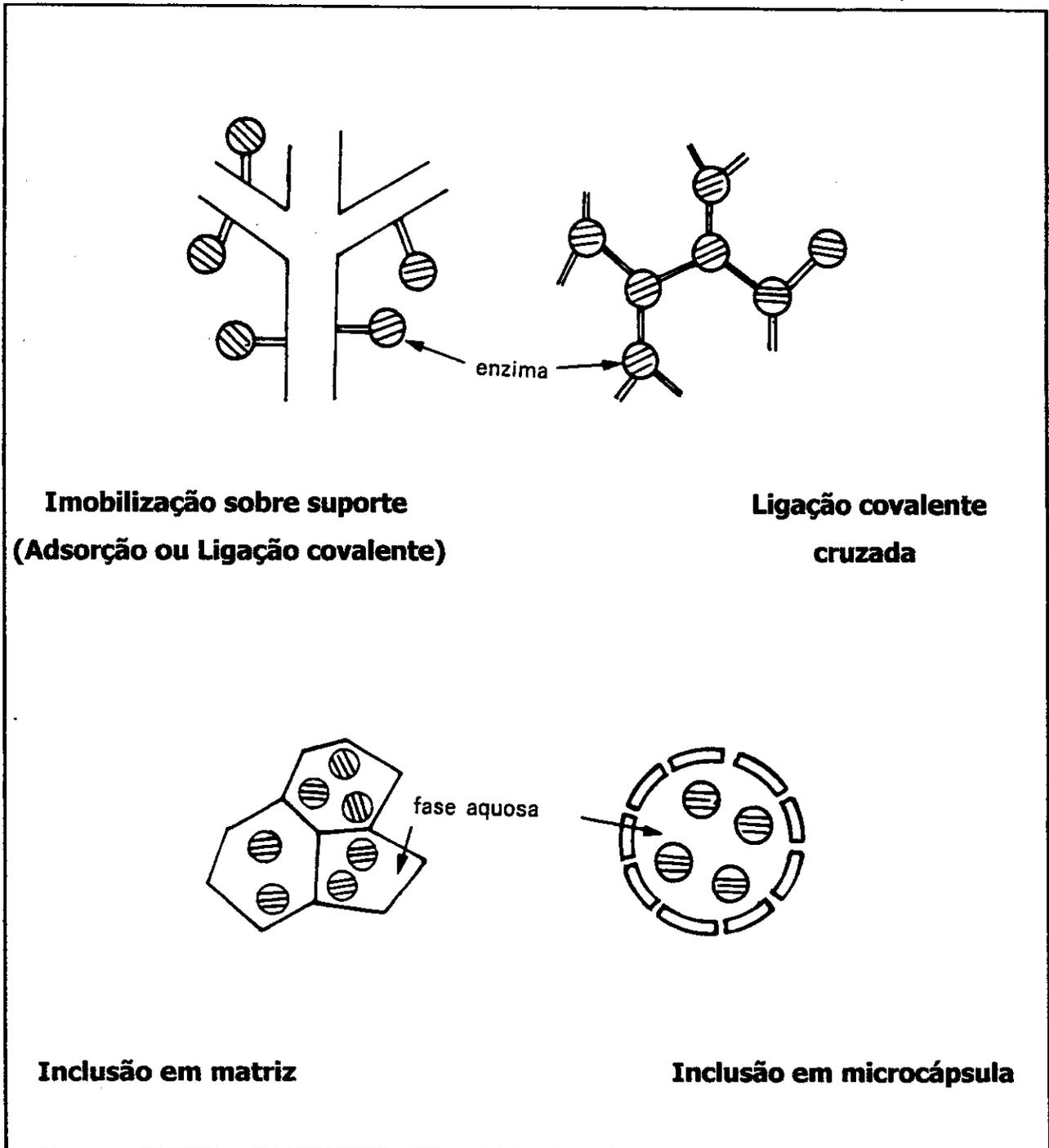


Figura 4.2. Representação esquemática de formas de imobilização de enzimas. Fonte: Scriban, 1985.

4.1. Imobilização por Oclusão em Matriz Polimérica

Na técnica de inclusão ou oclusão em matriz, as moléculas da enzima ficam confinadas na rede tridimensional de um polímero insolúvel em água, como ágar-ágar, carragenatos, álcool polivinílico, poli(acrilamida), borracha de silicone, amido e outros.

Nesse método, a enzima é dissolvida e dispersada numa solução de um monômero e, em seguida, ocorre a polimerização pela ação de um agente de reticulação com a presença de um colóide protetor (albumina, agarose ou dextrana).

A estrutura do polímero formada apresenta espaços intersticiais que propiciam a difusão de moléculas do substrato e dos produtos da reação, porém impedem a saída das moléculas da enzima. A vantagem encontrada nesta técnica reside no fato de que a enzima não está ligada diretamente ao suporte e conserva sua integridade molecular, a enzima não sofre nenhuma modificação na sua estrutura. Entretanto, é uma técnica pouco utilizada devido aos fenômenos de difusão através do gel e dificuldade de obtenção de polímeros com tamanho de interstícios uniformes.

4.2. Imobilização por Microencapsulação

A técnica de microencapsulação consiste no confinamento da enzima em microcápsulas, delimitadas por membranas semipermeáveis cujos poros podem variar de 5 a 300 μm , permitindo assim a livre movimentação de substratos e produtos da reação enzimática sem possibilitar a saída da enzima.

Nesta técnica, o aprisionamento de um número de moléculas é maior que o processo anterior e, também, permite a imobilização simultânea de várias enzimas numa única etapa. No entanto, exige alta concentração enzimática para a microencapsulação, pode ocorrer restrição de passagem de alguns substratos pelos poros da membrana e, ainda, a dificuldade de fixar essas microcápsulas num sensor tem limitado a aplicação deste processo na construção de biossensores.

4.3. Imobilização por Adsorção

A técnica de adsorção de enzimas em suportes sólidos insolúveis é resultado de forças de interação de baixa energia, como ligações de van der Waals, pontes de hidrogênio e ligações iônicas.

O processo é simples, suave e não deletério para a maioria das enzimas, sendo desprezíveis os efeitos difusionais. Por outro lado, possui a grande desvantagem de deixar a enzima absorvida extremamente dependente de fatores ligados ao meio reacional, tais como pH, solventes, substratos e temperatura. Os suportes geralmente possuem superfície ativa e funcionam como excelentes adsorventes, sendo que os mais utilizados são o grafite, resinas de troca iônica, vidro, carvão vegetal, sílica gel, alumina, celulose e derivados, amido, bentonita, entre outros.

4.4. Imobilização por Ligação Covalente

Na fixação por ligação covalente a enzima é ligada ao suporte inerte por meio de ligações químicas covalentes, as quais são, normalmente, estabelecidas entre os grupos não ativos da enzima (hidroxila, carbonila, amino, fenólico, tiol, imidazólico) com os grupos reativos do suporte presentes na superfície sólida do suporte.

Como a reação química de formação da ligação covalente deve ser o menos desnaturante possível para a enzima, é necessária uma ativação prévia dos grupamentos suscetíveis de entrar em reação. Por razões ligadas à dificuldade de manter intacta a atividade da enzima, geralmente, escolhe-se ativar o suporte. No método de ligação covalente, a enzima é mantida num ambiente semelhante ao que ela se encontra na natureza e deste modo possui maior estabilidade frente aos efeitos de pH, força iônica, solvente e temperatura.

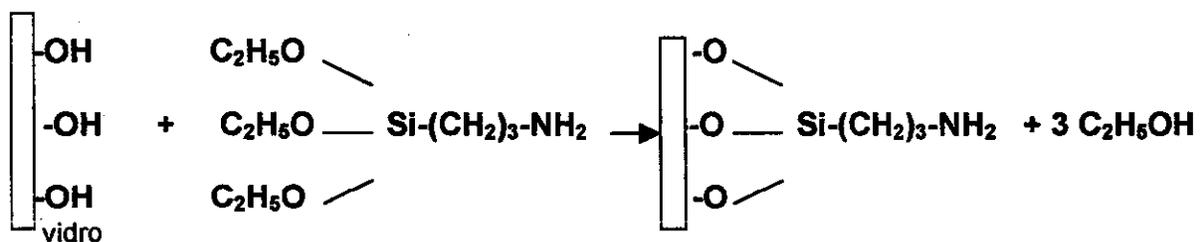
4.5. Imobilização por Ligação Covalente Cruzada

O método de ligação covalente cruzada emprega o uso de reagentes bifuncionais na imobilização do material biológico.

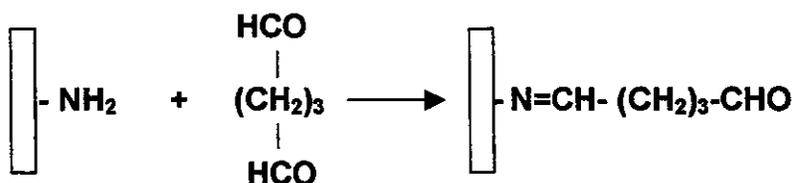
O método baseia-se na formação de estruturas de massa molecular elevadas em decorrência da formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzimas e/ou moléculas de suporte inerte com reagentes bifuncionais. Alguns destes reagentes incluem: glutaraldeído (pentanodiol), ácido bisdiazobenzidina 2-2'-dissulfônico, 4,4'-difluor-3,3'-dinitrodifenilssulfona, tricloro-o-triazina, etc.

O glutaraldeído tem sido mais usado devido à baixa toxicidade e menor custo quando comparado aos demais. Além disto, as ligações entre a enzima e glutaraldeído são irreversíveis, conferindo boa estabilidade frente a variações de pH, força iônica, solvente e temperatura. A reação mais provável, envolvendo o glutaraldeído ocorre entre os grupos aldeídos do reagente com grupos amina livres da enzima, como pode ser representado na figura 4.3 (Scriban, 1985; Gorton et al., 1994).

a) Silanização



b) Acoplamento com glutaraldeído



c) Adição da enzima

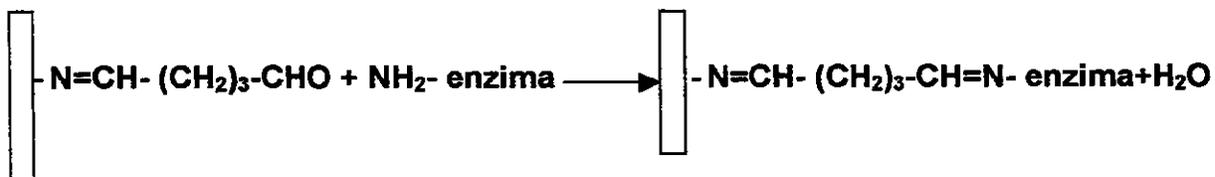


Figura 4.3. Provável mecanismo de ligação entre o vidro silanizado e a enzima, através do glutaraldeído. Fonte: Gorton et al., 1994.

Capítulo V

Biossensores e Reatores Enzimáticos

1. Introdução

Atualmente, uma das principais preocupações da Química Analítica está diretamente ligada à detecção rápida e específica de uma série de substâncias presentes em amostras complexas. Estes problemas estão associados, principalmente, à necessidade de controle de reações de fermentação, diagnósticos e tratamentos de distúrbios da saúde, monitoramento ambiental, controle de qualidade de alimentos e medicamentos. Para este fim, os biossensores e os reatores enzimáticos são promissores no aprimoramento da detecção e da quantificação de diversos parâmetros químicos e biológicos. Assim, a pesquisa em biossensores e reatores enzimáticos tem crescido significativamente, em virtude de sua potencialidade para a solução destes desafios (Vadgma & Crump, 1992; de la Guardia, 1995). O campo das análises clínicas tem sido muito beneficiado com o desenvolvimento destas ferramentas analíticas (Alvarez-Icaza & Bilitewski, 1993). O reconhecimento molecular seletivo do analito é o principal objetivo da tecnologia envolvida na construção dos biossensores e reatores enzimáticos. O reconhecimento molecular pode ser alcançado pelo uso de sistemas de afinidade, tais como enzimas/substratos, anticorpos/antígenos e seqüências de ácido nucléico/seqüências complementares (figura 5.1). Em alguns casos, sistemas complexos podem ser utilizados, incluindo hormônios, bactérias, microrganismos, células completas, tecidos vegetais e

animais e organelas. Entretanto, as enzimas têm sido o principal material biológico utilizado na produção dos biossensores, pois aliam especificidade e sensibilidade à facilidade de acoplamento a um transdutor (de la Guardia, 1995).

O transdutor é um dispositivo capaz de transformar um tipo de sinal em outro, convertendo o sinal gerado pelo sensor biológico em um sinal óptico ou elétrico que pode ser amplificado e processado. O transdutor é capaz de converter uma energia de entrada em outra energia de saída, geralmente diferente, mas mantendo uma relação conhecida entre elas. Diferentes transdutores têm sido empregados, sendo que os mais usados na construção de biossensores são os amperométricos, potenciométricos e ópticos. Outros tipos são também utilizados, porém em menor escala, como piezelétricos e calorimétricos (Scheller et al., 1989; Fatibello & Capelato, 1992; Vadgama & Crump, 1992; de la Guardia, 1995;).

A definição e diferenciação entre biossensores e reatores enzimáticos nem sempre é clara. Alguns autores em artigos de revisão definem como biossensor o dispositivo que emprega um material biológico (enzimas, antígenos, células, organelas, tecido animal ou vegetal, etc.) imobilizado sobre um transdutor ou em contato físico íntimo ao transdutor (Scheller et al., 1989; Vadgama & Crump, 1992; Fatibello & Capelato, 1992; Reshetilov, 1996; Sorochinskii & Kurganov, 1997; Rosatto et al., 2001). No reator enzimático o material biológico é imobilizado sobre um suporte adequado e integrado num sistema contendo um transdutor, sendo particularmente útil para análise em fluxo (Gorton et al., 1994). Entretanto, outros autores definem biossensor como dispositivos onde o componente biológico está imobilizado, geralmente, próximo ao transdutor (Alvarez-Icaza & Bilitewski, 1993). Outro autor (de la Guardia, 1995) classifica os biossensores através de diferentes critérios. Um destes parâmetros é a relação entre o receptor (material biológico) e o transdutor, onde o material biológico pode estar integrado ou conectado a este. Assim, o reator enzimático poderia ser designado como um tipo de biossensor.

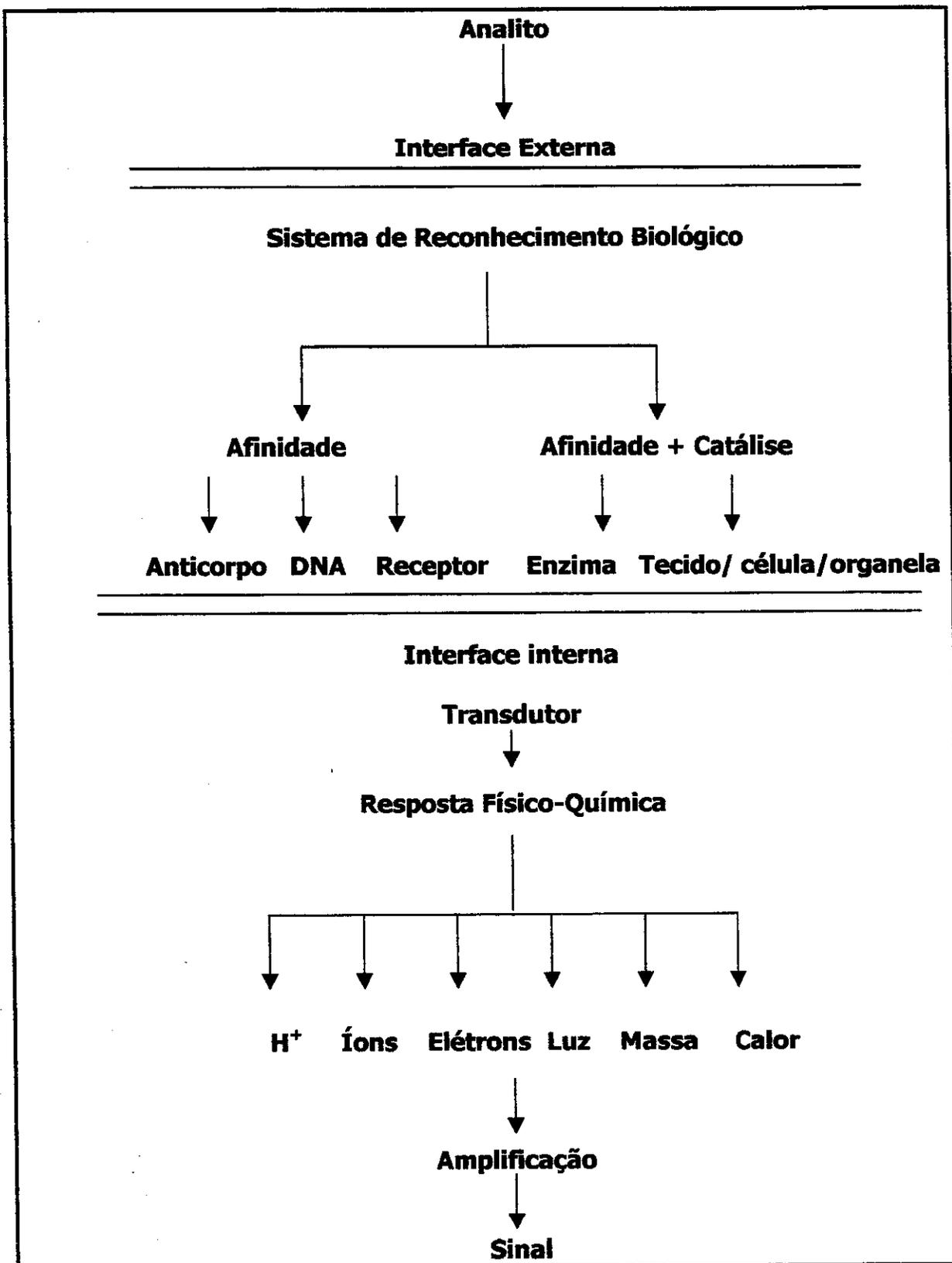


Figura 5.1. Diagrama esquemático de possíveis mecanismos de reconhecimento de um biossensor. Fonte: Vadgama & Crump, 1992.

2. Aplicações

Os biossensores são uma ferramenta analítica bastante versátil em função de sua capacidade de detecção rápida e específica de diversos compostos de interesse em diferentes matrizes. Além disto, os biossensores aliam as vantagens de especificidade e sensibilidade a outras propriedades atrativas, tais como simplicidade de preparo, baixo custo, rapidez de análise e possibilidade de miniaturização (Wang, 1993).

Na área médica, os biossensores têm sido empregados em dosagens de diferentes analitos visando avaliação de distúrbios da saúde, acompanhamento de tratamentos e intoxicações. Entre uma série de substâncias podem ser citadas aminoácidos (distúrbios metabólicos), ácido oxálico, uréia e creatinina (diagnóstico e monitoramento de desordens renais), ácido láctico (diagnóstico e tratamento de doenças associadas com sobrecarga muscular, ex: atletas), colesterol (alterações lipídicas), glicose (controle da diabete e outros desequilíbrios de glicemia), pesticidas, medicamentos, etc. (Reshetilov, 1996; Sorochinskii & Kurganov, 1997; Sorochinskii & Kurganov, 1998; Liang et al., 2000).

A determinação das taxas sanguíneas de glicose é, sem dúvida, uma das principais aplicações na área médica, existindo diferentes tipos de biossensores comercialmente disponíveis (Alvarez-Icasa & Bilitewski, 1993; Raba & Mottola, 1995). Em recente revisão, Liang e colaboradores (Liang et al., 2000) apontam inúmeros biossensores que são, comumente, empregados em medicina.

Uma aplicação específica de biossensores na análise clínica é o monitoramento "in vivo", com a finalidade de detectar continuamente mudanças em tempo real de parâmetros indicativos da saúde do paciente. Entretanto, este uso está limitado pelo fato dos sensores terem de operar em condições reversíveis, para assegurar um longo período de uso. Além disto somam-se os problemas de implantação e a biocompatibilidade do material a ser empregado, uma vez que permanecerá em contato direto com o paciente (de la Guardia, 1995).

Na área da biotecnologia, sobretudo nas indústrias de alimentos e farmacêutica, os biossensores tem sido empregados para o controle em processos de fermentação e monitoramento de vários substratos e produtos de reações bioquímicas. As substâncias mais dosadas através de biossensores são lisina, etanol, ácido glutâmico e penicilina. No entanto, controles realizados diretamente no meio reacional em processos fermentativos tem sido pouco apresentados. Isto ocorre em função de algumas características dos processos que interferem no desempenho do biossensor, como as etapas de esterilização do meio que podem desnaturar o componente biológico, elevadas temperaturas durante o processo operacional e, geralmente, a concentração do analito que excedem a faixa de resposta do biossensor (Sheller et al., 1989).

Em estudos ambientais, a preocupação crescente com o meio ambiente tem dirigido pesquisas para o desenvolvimento de biossensores capazes de detectar compostos poluentes perigosos para o ecossistema. Assim, têm surgido trabalhos visando o desenvolvimento de biossensores para a detecção de diversas substâncias como fenóis e seus derivados. Os fenóis e seus derivados, como clorofenóis e compostos aromáticos relacionados são conhecidos devido à elevada toxicidade e por serem compostos comuns em efluentes industriais, oriundos das atividades da produção de plásticos, corantes, tintas, antioxidantes, polímeros sintéticos, resinas, pesticidas, detergentes, desinfetantes, refinaria de óleo e principalmente papel e celulose. Este é um campo de pesquisa bastante amplo a ser explorado (Reshetilov, 1996; Rosatto et al., 2001).

A grande variedade de reações em meios biológicos distintos, associada à disponibilidade de vários transdutores, fornece inúmeras opções para o desenvolvimento de métodos analíticos. Deste modo, deve-se fazer a escolha adequada do receptor biológico, do transdutor e estabelecer as melhores condições para o sistema estudado.

Capítulo VI

Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

1. Introdução

A Análise Química por Injeção em Fluxo, é a versão mais usual em português do termo em inglês "*Flow Injection Analysis*" de onde deriva a sigla FIA, internacionalmente conhecida. Esta técnica foi desenvolvida nos anos 70 por Ruzicka e Hansen (Ruzicka & Hansen, 1975) baseado na injeção da amostra num fluxo carregador não segmentado por bolhas de ar. A análise por injeção em fluxo pode ser definida como um processo de automatização de procedimentos analíticos, no qual a amostra em solução é introduzida em um fluido carregador que transporta a mesma em direção a um detector. Esta técnica, quando introduzida, teve grande repercussão na comunidade científica, sendo atualmente um dos métodos de automatização, baseadas em fluxo, mais empregados em virtude de sua grande versatilidade de aplicação (Couto & Montenegro, 2000). Além disto, características importantes do processo FIA são:

- O módulo de análise é um sistema fechado e, uma vez introduzida a alíquota da amostra no percurso analítico, as reações químicas e a detecção ocorrem sem nenhum contato externo;
- A análise química em fluxo contínuo a vazão constante faz com que o tempo de trânsito entre o injetor e o detector seja exatamente o mesmo para padrões e amostras, podendo em vista disto, serem feitas as leituras, sem a reação se

completar;

- O módulo de análise é desenvolvido a partir do conhecimento das reações químicas envolvidas. Investiga-se então, a otimização das variáveis afim de se que obtenha o melhor desempenho;
- Pode ser implementada com instrumentação de baixo custo, utilização de pouca vidraria e com pequeno consumo de reagentes (Karlbery & Pacey, 1989; Reis, 1996; Zagatto et al., 1999).

Resumidamente, pode-se dizer que a análise por injeção em fluxo é uma técnica de automação que, basicamente, combina três princípios básicos: injeção de amostra, dispersão controlada da amostra injetada e reprodutibilidade no tempo dos eventos. O volume injetado, a vazão do carregador e o tempo de residência são parâmetros que afetam a dispersão da amostra. A grandeza da dispersão da amostra é muito importante no desenvolvimento de um método FIA pois, esta se relaciona diretamente com a sensibilidade, com a frequência de amostragem e o grau de mistura entre os reagentes (Reis et al., 1989; Reis, 1996; Zagatto et al., 1999).

O crescente interesse no desenvolvimento e aplicação da análise automatizada nestes últimos 40 anos pode ser justificado por inúmeras razões, tais como:

- Aumento da performance analítica, particularmente em relação à precisão dos resultados;
- Possibilidade de utilização mais eficiente da capacidade instrumental e uso mais racional dos reagentes químicos;
- Substituição do operador humano em operações perigosas e repetitivas;
- Diminuição de custos e possibilidade de análise de um grande número de amostras.

Em Química Analítica, a busca da substituição, total ou parcial, de operações manuais por dispositivos mecânicos capazes de executá-las mais rapidamente e de

forma reprodutível, de modo geral, é denominada de "automação" de um procedimento analítico. O dispositivo mecânico que substitui o operador na execução das operações de uma dosagem é denominado "analisador automático". Entretanto, numa definição mais exata, os instrumentos automáticos são aqueles que têm pelo menos uma etapa de realimentação, ou seja, tem-se um elemento de decisão não humano. Assim, muitos sistemas de fluxo podem ser melhor designados como instrumentos mecanizados, onde executam funções previamente determinadas sem a intervenção humana, porém não podem tomar decisões ou mudar o curso da análise durante sua execução (Calatayud, 1996).

Os sistemas em fluxo podem medir diretamente uma propriedade da espécie dissolvida na amostra injetada ou exigir reações químicas ou enzimáticas para a conversão da espécie química de interesse em outra com propriedades mais favoráveis às determinações. Os métodos envolvendo biossensores e reatores enzimáticos têm sido empregados com esta finalidade. A partir de reações enzimáticas há a formação de "novas espécies", as quais serão detectadas (Reis, 1996).

Os biossensores, os reatores enzimáticos e os sistemas de fluxo são totalmente compatíveis, tendo se verificado desde 1988 um aumento significativo dos trabalhos envolvendo estes dispositivos em sistemas de análise em fluxo (de la Guardia, 1995). Particularmente, tem sido demonstrada a praticidade desta combinação em métodos de rotina em análises clínicas (Murachi & Tabata, 1988). O uso de enzimas imobilizadas em sistemas de análise por injeção em fluxo permite o desenvolvimento de análises rápidas em sistemas simples e específicos com o consumo de quantidades reduzidas de reagentes (Reis, 1996).

2. Configuração de Sistemas

A versatilidade do FIA fica evidente pela a ampla gama de possibilidades que se abrem ao incorporar vários procedimentos analíticos usuais ao processo de análise por injeção em fluxo contínuo. Pode-se citar como exemplos destes procedimentos extração por solventes, destilação, concentração e separação com resina de troca iônica, uso de membranas para separação de fase gasosa, etc (Reis et al., 1989; Karlbery & Pacey, 1989).

O uso de membranas de difusão gasosa tem sido usado há vários anos em sistema de fluxo para aumento de seletividade, uma vez que apenas algumas espécies são suficientemente voláteis à temperatura ambiente (Lázaro & Luque de Castro, 1988). A técnica de difusão/permeação é, freqüentemente, usada para a separação e/ou pré-concentração de uma vasta variedade de substâncias inorgânicas (gases, compostos voláteis e gás envolvendo íons como amônio, carbonatos, sulfetos, etc.) e substâncias orgânicas voláteis (fenóis, aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos carboxílicos, etc.) advindas de amostras aquosas ou gasosas (Kubán, 1992).

As membranas podem ser usadas em FIA para transferir certos compostos de um fluxo doador (amostra) para um fluxo receptor (detector). O gás absorvido muda o pH do fluxo receptor, e isto pode ser medido espectrofotometricamente, via um indicador ácido-base, sendo a variação da absorbância proporcional à concentração do analito. Métodos condutométricos são também empregados, sendo o princípio baseado na mudança de condutividade de um fluxo receptor pela absorção dos compostos voláteis (Kubán & Dasgupta, 1993).

A diálise gasosa tem sido utilizada com êxito em FIA para a análise em diversos setores, particularmente, na química clínica (Kubán, 1992). Baadenhuijsen e Seuren-Jacobs (Baadenhuijsen e Seuren-Jacobs, 1979) foram os primeiros a explorar este conceito em FIA, num procedimento para determinação de gás carbônico em plasma, usando membrana para a separação do componente

gasoso.

O sistema FIA emprega os componentes básicos usuais associados a uma cela de permeação gasosa, a qual contém uma membrana semi-permeável que deve apresentar boa estabilidade química e física (Kubán, 1992). Nos sistemas de fluxo com membranas de difusão gasosa as variáveis de significância são, principalmente a vazão, o tipo de membrana e o procedimento de instalação da mesma (Tryzel & Karlberg, 1995).

O modo de permeação de uma membrana depende de sua morfologia, podendo ser empregados diversos materiais. Em função de sua estrutura pode-se classificá-las em densas, porosas e assimétricas ou compósitas (Windmüller, 1991).

Atualmente, a pesquisa de novos polímeros relacionando-se estrutura, permeabilidade e seletividade têm ampliado o emprego das membranas de difusão/permeação em diversas áreas da análise química (Pandey e Chauhan, 2001).

Capítulo VII

Material e Métodos

1. Material

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções preparadas com água recém desionizada.

A enzima *salicilato hidroxilase* (E.C.1.14.13.1) e coenzima β -NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) foram da marca Sigma®.

As pérolas de vidro (CPG-240 / controlled pore glass) utilizadas para o preparo do reator enzimático também foram da marca Sigma® com granulação de 80-120 mesh e porosidade de 22,6 nm.

A resina utilizada para o preparo da membrana de silicona foi o adesivo de silicona Silastic® fabricado pela Dow Corning.

As amostras de soro sanguíneo humano foram gentilmente cedidas pelo Hospital das Clínicas da UNICAMP. Nestas amostras adicionou-se solução-padrão de salicilato de modo a obter as concentrações desejadas. Foram cedidas, também pelo Hospital das Clínicas da UNICAMP, algumas amostras já contendo salicilato para a quantificação, as quais foram utilizadas para comparação com o método de referência (Trinder, 1954).

As amostras de medicamentos foram adquiridas no comércio farmacêutico local.

1.1. Preparo de Soluções

a) Soluções-Padrão de Salicilato

As soluções-padrão de salicilato de sódio foram feitas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ / pH 7,6 (preparo do tampão fosfato de sódio / fosfato de potássio apresentado no item *g* - p.67), a partir de solução estoque de salicilato de concentração de 0,01 mol L⁻¹ e armazenadas a 4°C por até seis meses. A solução estoque de salicilato de sódio foi feita pela dissolução de 0,1601 g de salicilato de sódio em 100 mL do tampão escolhido.

b) Solução de Coenzima (NADH)

As soluções de coenzima foram preparadas diariamente com o mesmo tampão. Empregaram-se soluções nas proporções de 1 mol de salicilato para 1 mol de coenzima, 1 mol de salicilato para 2 moles de coenzima, 1 mol de salicilato para 3 moles de coenzima e 1 mol de salicilato para 4 moles de coenzima.

c) Solução Ácida 4-aminofenol

O reagente foi preparado pela dissolução de 100 mg do reagente 4-aminofenol (4- amino-1-hidroxibenzeno) em água desionizada e completado para um 1 litro com uma solução 0,1 mol L⁻¹ de ácido clorídrico. Este reagente é estável por um ano quando estocado a 4°C em frasco escuro (Chubb et al., 1986).

d) Solução de Fe III

A solução de Fe III foi preparada por de dissolução, sob aquecimento, de 40 g de cloreto mercúrico em 850 mL de água desionizada. Após resfriamento,

adicionaram-se 40 g de nitrato férrico hidratado $[\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9(\text{H}_2\text{O})]$ dissolvido em 120 mL de solução de ácido clorídrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e completou-se o volume para 1 litro com água desionizada (Trinder, 1954).

e) Solução de FeIII sem adição de cloreto mercúrico

A solução de Fe III foi feita pela dissolução de 10 g nitrato férrico hidratado $[\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9(\text{H}_2\text{O})]$ em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido nítrico até completar o volume de 1 litro (Keller, 1947).

f) Solução de Púrpura de Bromocresol (BCP)

A solução deste indicador foi feita pela dissolução de 0,27 g de púrpura de bromocresol (dibromo-*o*-cresolsulfaleína) em 20,0 mL de etanol, completando-se o volume para 500 mL com água desionizada deaerada. A partir desta solução estoque ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi feita uma diluição para o preparo da solução de trabalho ($2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). O pH foi ajustado para 7,0 com adição de solução de NaOH ($2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), gota a gota. A seguir, borbulhou-se argônio por cerca de 30 minutos. Para se evitar absorção de gás carbônico do ar, esta solução foi arrolhada e vedada, sendo que, para a sucção e respiro de mesma, foi adaptado em sua rolha um tubo de polietileno conectado com o sistema e outro tubo contendo pastilhas de $\text{CaCl}_2/\text{NaOH}/\text{CaCl}_2$, como mostra a figura 7.1, de modo que o ar ingressante estivesse livre do gás carbônico.

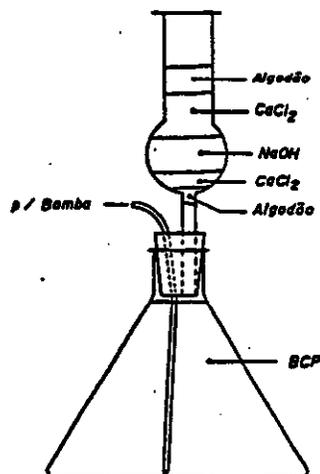


Figura 7.1. Recipiente para armazenamento da solução de indicador.

g) Solução Tampão Fosfato

Preparou-se uma solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ / pH 7,6 empregando-se solução de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e solução de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A solução de fosfato de potássio monobásico foi feita empregando-se 11,88 g do sal seco, a $110\text{-}115 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h, e dissolvendo-se em água desionizada, previamente fervida e resfriada até completar o volume de 1 litro. A solução de fosfato de sódio dibásico foi preparada dissolvendo-se 2,27 g do sal em água deionizada, previamente fervida e resfriada, até completar o volume de 250 mL. Adicionou-se, então, 150 mL da solução de fosfato de potássio em balão volumétrico de 1000mL e completou-se o volume com a solução de fosfato de sódio. Mediu-se o pH e, se necessário fez-se o ajuste com solução de hidróxido de sódio 0,1 % (m/v), gota a gota.

h) Solução de Glutaraldeído

As soluções de glutaraldeído (pentanodiol) de 2,5 % e 12,5 % (v/v) foram obtidas a partir de solução de glutaraldeído 25% (v/v) diluídas em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0).

1.2. Preparo de Amostras

a) Amostras de Soro

As amostras de soro empregadas para a dosagem de salicilato, através da formação de gás carbônico, sofreram um tratamento para a retirada do ácido carbônico presente. Os fluídos intra e extra celulares dos organismos vivos contêm pares ácido-bases conjugados que agem como tampões. O principal tampão extracelular no sangue dos vertebrados é o sistema tampão bicarbonato ($\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{HCO}_3^-$). A presença destes compostos gera interferência e, portanto, devem ser eliminados. Isto foi feito pela adição, para cada mL de soro, de 0,5 mL de solução ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), seguindo-se a neutralização com 0,5 mL de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,6). Posteriormente, fez-se a dopagem com os padrões de salicilato.

Na determinação de salicilato por complexação com 4-aminofenol, as amostras de soro empregadas para estabelecimento de condições ideais para o sistema e testes de recuperação não sofreram qualquer pré-tratamento, apenas a dopagem com soluções padrão de salicilato. Nas amostras recebidas, contendo salicilato, não se realizou qualquer pré-tratamento.

b) Amostras de Medicamentos contendo Ácido Acetilsalicílico

Para a análise dos medicamentos é necessária a hidrólise do ácido acetilsalicílico para ácido salicílico. Esta hidrólise foi feita de acordo com a Farmacopéia Brasileira (Farmacopéia Brasileira, 1988). Pesou-se cerca de 1,5 g de cada amostra de medicamento, pesados com exatidão de $\pm 0,2 \text{ mg}$, e adicionaram-se 50,0 mL de solução $0,500 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH, previamente padronizada. Aqueceu-se a mistura, brandamente, por aproximadamente 10 min. As amostras destinadas a dosagem enzimática foram, depois de resfriadas,

neutralizadas com ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para um pH próximo de 7,6. A seguir, o volume foi completado em balões volumétricos, com soluções de tampão fosfato, ajustando-se a concentração de salicilato à faixa adequada.

1.3. Aparelhos e Acessórios

- Bomba peristáltica (Ismatec MP 13GJ4)
- Registrador (Cole Palmer)
- Espectrofotômetro (Carl Zeiss, Modelo PM2D)
- Banho Termostático (RC6 Lauda)
- Válvula introdutora de amostra (Tubino & Barros, 1991)
- Cella de permeação gasosa (van der Linden, 1983)
- Tubos de Tygon® (1,65 mm de diâmetro interno – Ismatec Two-Stop / Blue-Blue)
- Tubos de polietileno (1,0 mm de diâmetro interno)
- Tubos de náilon (2,0 mm de diâmetro interno)

2. Métodos

A dosagem de salicilato envolveu a enzima *salicilato hidroxilase* imobilizada integrada em sistema de injeção em fluxo. A reação enzimática exige a presença de coenzima (NADH) e oxigênio para converter salicilato em catecol, produzindo gás carbônico, água e coenzima oxidada. A determinação do salicilato foi feita por dois métodos espectrofotométricos. Em um dos métodos fez-se o monitoramento de um complexo formado a partir de catecol gerado na reação enzimática e, no

outro método, mediu-se a mudança de coloração de um indicador ácido-base pela formação de gás carbônico, também gerado pela reação enzimática.

2.1. Métodos de Imobilização Enzimática

Foram feitos diversos estudos para obtenção do reator enzimático empregando-se diversos materiais, tais como tubo de vidro com a superfície ativada por ácido fosfórico, resina de troca iônica (amberlite), casca de salgueiro em pó (*Salix alba*), pérolas de vidro de porosidade controlada e tubos de náilon. Os de melhores resultados foram obtidos pelo o método que empregou tubo de náilon como suporte da enzima e pelos que empregaram pérolas de vidro com a silanização desenvolvida em meio orgânico e meio aquoso. Assim serão estes os métodos apresentados a seguir.

2.1.1. Imobilização em Esferas de Vidro em Meio Aquoso

A imobilização foi feita baseada no método apresentado por Leon-Gonzales e Townshend (Leon-Gonzales & Townshend, 1990).

A primeira etapa consistiu na limpeza das esferas de vidro. Cerca de 0,2 g deste material foi fervido em solução de ácido nítrico a 5 % (v/v), por 30 min, sob agitação constante. Filtrou-se em funil de vidro de placa porosa, com auxílio de trompa de vácuo, e lavou-se com água desionizada. A seguir secou-se em estufa a 95 °C por aproximadamente 2 h.

Seguiu-se a etapa relativa à silanização. Empregou-se 1,0 mL de aminopropil-trietoxi-silano diluído em 9,0 mL de água deionizada. Ajustou-se o pH para 3,5 com ácido clorídrico 0,5 mol L⁻¹, gota a gota. Foram adicionadas as esferas de vidro secas e aqueceu-se a mistura até 75 °C, em banho-maria, por 2 h e 30 min, com agitação a cada 15 min, de forma a facilitar a interação da solução

com as esferas de vidro. Após o aquecimento as esferas foram filtradas, lavadas e secas por 10-12 h em temperatura ambiente.

Posteriormente, adicionou-se ao vidro aminoalquilado 20,0 mL de uma solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v). A reação seguiu por cerca de 1 h em temperatura ambiente. As esferas de vidro ativadas foram filtradas e lavadas com água desionizada. O desenvolvimento de cor característica (salmão claro) era indicativo do sucesso das etapas até então envolvidas.

Por fim, adicionou-se a enzima sobre as esferas de vidro ativadas. Pesou-se a enzima *salicilato hidroxilase* de modo a obter 10 unidades de enzima, dissolvendo-a em 3,0 mL de tampão fosfato resfriado a 4 °C (0,1 mol L⁻¹; pH=7,6). Esta solução contendo a enzima foi adicionada sobre as esferas de vidro ativadas deixando em contato por cerca de 12 h a 4 °C. As esferas de vidro com a enzima imobilizada foram, então, lavadas com tampão fosfato resfriado (4 °C) e depois com água fria (4 °C) para remoção de enzima não ligada. Com este material assim preparado, foram feitos os reatores enzimáticos descritos no item 2.1.4. (p.73).

2.1.2. Imobilização em Esferas de Vidro em Solvente Orgânico

A imobilização em meio orgânico, baseou-se na técnica apresentada por Zaitsev e colaboradores (Zaitsev et al., 1991), entretanto, foram feitas diversas alterações. Após a limpeza das esferas de vidro em ácido nítrico, fez-se a silanização utilizando xileno. 1,0 mL de aminopropil-trieoxi-silano diluído em 19,0 mL de xileno foi misturado com as esferas de vidro lavadas e secas. A mistura foi aquecida por 3 horas a 100 °C, sob refluxo. Em seqüência, lavou-se as esferas de vidro com xileno, etanol e água deionizada, nesta ordem, empregando funil de vidro sinterizado com auxílio de trompa de vácuo. Secou-se em temperatura ambiente por 10-12 h.

Fez-se a adição de solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v), às esferas de vidro, deixando em contato por cerca de 1 h. A seguir, fez-se adição da enzima e a obtenção do reator de modo similar ao do processo em meio aquoso.

2.1.3. Imobilização em Tubos de Náilon

A imobilização em náilon baseou-se no método apresentado por Mascini e colaboradores (Mascini et al., 1983), com diversas modificações no procedimento. Neste trabalho empregou-se o polímero náilon na forma tubular, uma vez que o reator foi idealizado para ser usado em sistema de injeção em fluxo e, deste modo, poderia ser acoplado diretamente ao sistema.

O náilon, para poder ser utilizado como suporte no processo de imobilização tubular, deve passar por modificações químicas e, assim, permitir a ativação dos grupamentos aptos a realizar as reações de acoplamento com a molécula enzimática. A primeira etapa foi relativa à quebra de ligações por ataque ácido. Passou-se através do tubo, ácido fórmico e a seguir metanol anidro durante 1 a 2 s cada reagente empregando-se para isto, uma seringa de vidro adaptada ao tubo de náilon. Os grupos carboxílicos, assim liberados, reagiram, numa segunda etapa, com uma solução de lisina ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$; pH 9,0) por 2 h. Lavou-se com solução de NaCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e a seguir adicionou-se solução de glutaraldeído 12,5 % (v/v). A última fase foi relativa à adição propriamente dita da enzima. Pesou-se a enzima de modo a obter pelo menos 10 unidades, dissolveu-se em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,6) e deixou-se em contato por cerca de 10-12 h a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, fez-se lavagem com tampão e água desionizada de modo a eliminar a enzima não ligada.

2.1.4. Construção da Coluna Enzimática

A coluna enzimática foi obtida pelo empacotamento das esferas de vidro sobre as quais a enzima foi imobilizada. Empregou-se para o empacotamento tubos de "Tygon®" (10,0 mm de diâmetro externo × 3,0 mm diâmetro interno) e comprimento de até 3,0 cm. A figura 7.2 ilustra o reator enzimático obtido, que foi integrado ao sistema de fluxo. A estocagem foi feita em geladeira (4 C°) em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,6) para preservação da atividade da enzima.

O tubo de náilon, após sofrer a imobilização enzimática nas suas paredes internas, era acoplado ao sistema FIA, sendo a estocagem realizada nas mesmas condições citadas acima.



Figura 7.2. Diagrama esquemático do reator enzimático empregando enzima imobilizada em pérolas de vidro. 1-tubo de "Tygon®"; 2-lã de vidro; 3-pérolas de vidro com a enzima imobilizada.

2.2. Método para a Determinação de Salicilato via Detecção de Catecol e Sistema FIA

A determinação de salicilato foi realizada pela detecção espectrofotométrica da espécie colorida, formada entre o catecol gerado na reação enzimática e o reagente 4-aminofenol em meio básico, a 565 nm. Esta reação descrita por Chubb e colaboradores (Chubb et al., 1986) foi adaptada para sistema de injeção em fluxo.

O sistema de injeção em fluxo empregado utilizou bomba peristáltica, tubos de "Tygon®", tubos de polietileno, espectrofotômetro e registrador potenciométrico. A válvula introdutora de amostra, construída em laboratório, foi descrita previamente por Tubino e Barros (Tubino & Barros, 1991).

A amostra contendo salicilato e coenzima é injetada e transportada pelo tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,6) ao reator enzimático. O catecol gerado pela reação enzimática é posteriormente misturado a uma solução ácida de 4-aminofenol 0,1 % (m/v). A seguir tem-se outra mistura com uma solução de hidróxido de sódio 1 % (m/v). Ocorre o desenvolvimento de uma espécie colorida com máxima absorção em 565 nm, que é proporcional à concentração de salicilato presente na amostra. Um diagrama esquemático para a determinação espectrofotométrica de salicilato é representado na figura 7.3.

2.3. Método para a Determinação de Salicilato via Detecção de Gás Carbônico e Sistema FIA

Nesta forma de dosagem de salicilato fez-se uso do gás carbônico formado na reação enzimática para relacioná-lo com a concentração de salicilato.

Neste método empregou-se um sistema FIA composto de bomba peristáltica, tubos de "Tygon®", tubos de polietileno, espectrofotômetro, válvula

introdutora de amostra, cela de permeação e registrador potenciométrico. Na célula de difusão ou permeação gasosa anteriormente descrita (van der Linden, 1983) empregou-se membrana de permeação de silicona. A figura 7.4 representa o sistema proposto.

A amostra contendo salicilato e coenzima é injetada e transportada pelo tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,6). Ao chegar ao reator enzimático há formação de gás carbônico. Devido, porém, ao pH de 7,6, este se apresenta principalmente sob a forma de HCO_3^- . Esta solução, então, é misturada com uma solução de ácido sulfúrico ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) para que ocorra a liberação do CO_2 . Em seguida, a solução resultante passa por uma cela de permeação ou difusão gasosa, contendo membrana de silicona, onde ocorre a permeação de CO_2 para uma outra solução contendo indicador ácido-base (púrpura de bromocresol) fluindo em direção ao detector. O pH da solução deste indicador é ajustado para 7,0 de modo que o CO_2 dissolvido provoca o abaixamento do pH alterando a cor da solução. A variação da absorbância é medida espectrofotometricamente a 580 nm. Este indicador apresenta uma coloração púrpura em pH maior que 7,0 e amarela em meio ácido.

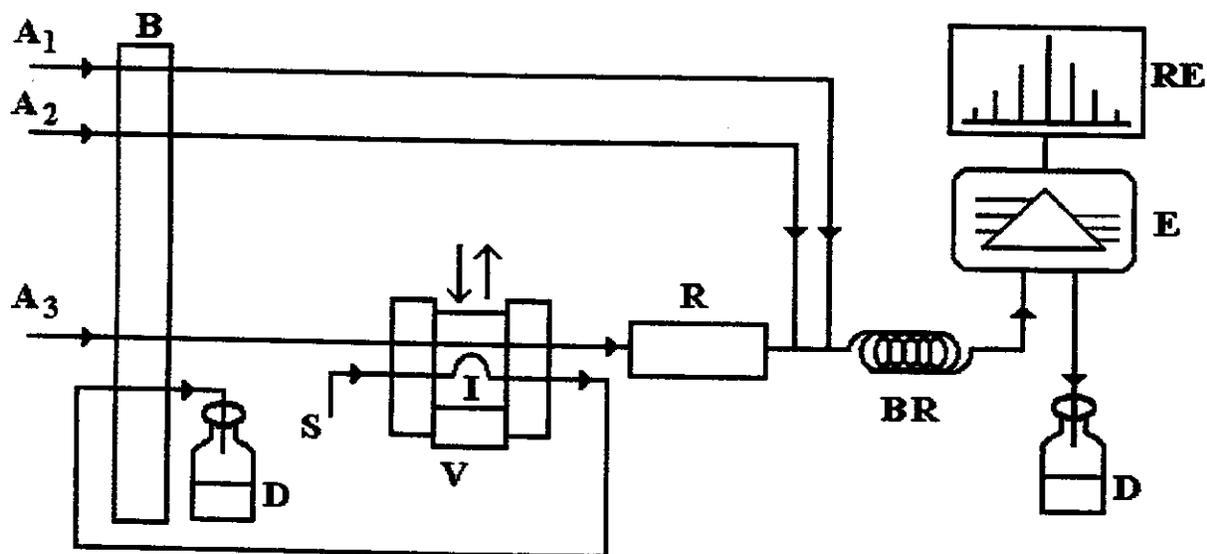


Figura 7.3. Diagrama esquemático do sistema FIA proposto para a dosagem espectrofotométrica via detecção de catecol. A₁ - solução de NaOH 1,0% (m/v); A₂ - solução ácida de 4-aminofenol 0,1% (m/v); A₃- tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹ ; pH 7,6); V- válvula introdutora de amostra; D- descarte; R- reator enzimático; I- alça de amostragem; S- amostra; B- bomba peristáltica; RE- registrador; E- espectrofotômetro; RE-bobina de mistura.

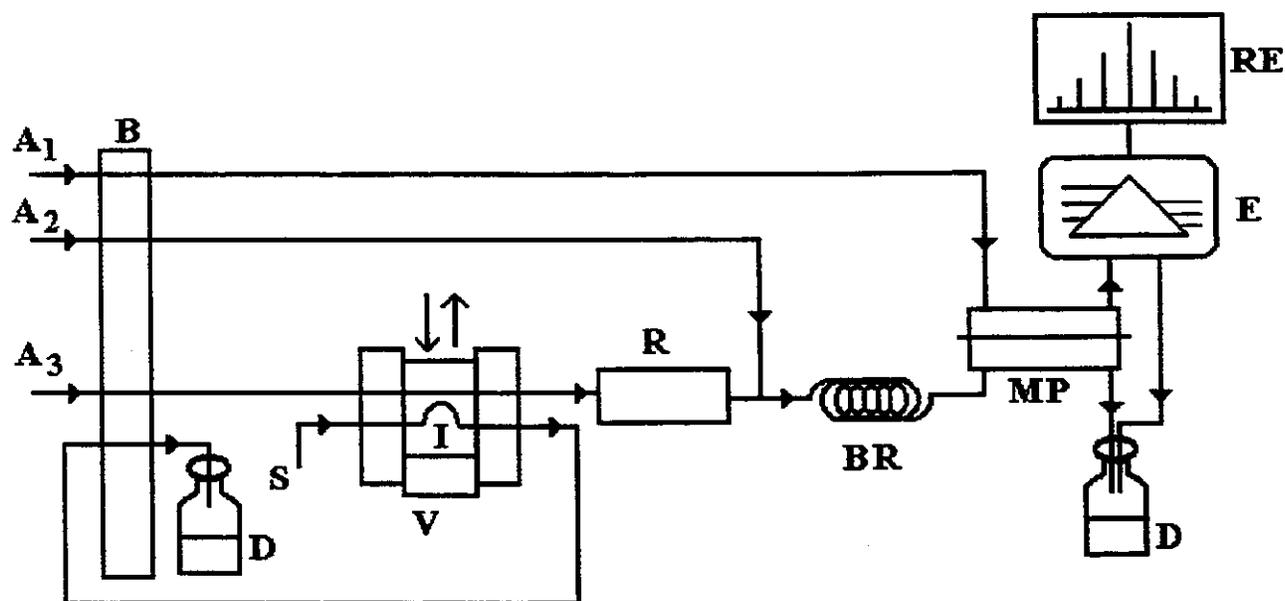


Figura 7.4. Diagrama esquemático do sistema FIA proposto para a dosagem espectrofotométrica via detecção de CO₂. A₁ - tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,6); A₂ - solução de ácido sulfúrico 1,0 mol L⁻¹; A₃ - solução de BCP 2,5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹; V - alça de amostragem; D - descarte; R - reator enzimático; I - alça introdutora de amostra; S - amostra; B - bomba peristáltica; RE - registrador; M - cela de difusão ou permeação gasosa; E - espectrofotômetro; RE - bobina de mistura.

2.4. Método Padrão

Como método padrão foi utilizado o de Trinder (Trinder, 1954). Seu princípio é baseado na complexação de íons de ferro III com o ácido salicílico formando-se um complexo de cor púrpura, conforme citado anteriormente, com máxima absorção a 540 nm. O reagente de Trinder além de cloreto férrico emprega cloreto de mercúrio II. A função deste é promover a precipitação de proteínas, sendo necessária centrifugação para a remoção das mesmas e posterior leitura. Utilizou-se, também, solução de íons de ferro III sem adição do cloreto de mercúrio (II) (Keller, 1947). Compararam-se as duas formas de dosagem, optando-se pelo reativo sem cloreto de mercúrio pela facilidade de manipulação e por não apresentar diferenças significativas na dosagem do salicilato. Entretanto, como a substância ativa dos reagentes é a mesma denomina-se, normalmente, reação ou princípio de Trinder.

Resumidamente, os procedimentos envolvem a adição de 0,2 mL de amostra, 0,8 mL de água destilada e 1,0 mL de solução de íons ferro III em cela espectrofotométrica. Misturam-se os reagentes e esperam-se 5 minutos para posterior leitura da absorbância a 540 nm.

2.5. Método Titulométrico para Determinação de Ácido Acetilsalicílico

O método empregado para dosagem de medicamentos contendo ácido acetilsalicílico foi o da Farmacopéia Brasileira (Farmacopéia Brasileira, 1988). A primeira etapa consiste na hidrólise do ácido acetilsalicílico presente nas amostras de medicamentos com solução de hidróxido de sódio $0,500 \text{ mol L}^{-1}$ previamente padronizada (preparo de amostras item 1.2 b – p.68). Feito isto, transfere-se a solução resultante para um erlenmeyer, espera-se resfriar e juntam-se duas gotas

de solução de fenoftaleína 1 % (m/v). Esta solução é titulada contra uma solução de ácido sulfúrico 1,00 mol L⁻¹ (padronizado). Assim titula-se a solução de hidróxido de sódio padronizada que não reagiu com ácido salicílico ficando em excesso.

2.6. Método de Preparação da Membrana de Silicona

As membranas de silicona foram preparadas de acordo com o método desenvolvido por Windmöller (Windmöller, 1991).

Dissolve-se adesivo de silicona Silastic® fabricado pela Dow Corning em tolueno, numa proporção em massa de 1,0 : 1,4. Faz-se uma agitação mecânica para sua homogeneização seguida de centrifugação para remoção de bolhas de ar. Posteriormente, coloca-se a mesma em uma placa de vidro recoberta com um filme plástico (PVC, polietileno ou "Teflon®"). Utiliza-se um fio de níquel-cromo de 0,4 mm como limitante de espessura e puxa-se a silicona que foi colocada na placa de vidro com o auxílio de um bastão de vidro, formando um filme. Após um período de 24 horas, retira-se o filme formado, guardando-o entre duas folhas de papel. A membrana formada é, então, cortada no tamanho adequado e presa na cela de permeação. A espessura final da membrana preparada neste trabalho é de 100 µm.

Capítulo VIII

Resultados e Discussão

1. Introdução

Neste trabalho, os métodos utilizados para a dosagem de salicilato, foram baseados na reação do mesmo com a enzima *salicilato hidroxilase* imobilizada, com formação de catecol e gás carbônico, os quais foram monitorados, como já apresentado anteriormente.

Empregando-se o sistema, onde foi feita a determinação espectrofotométrica da espécie formada, após reação com catecol, escolheu-se o reator enzimático mais adequado e foram realizados ensaios visando estabelecer as condições adequadas para seu melhor desempenho, tais como temperatura, pH, relação entre coenzima e substrato e vazão. Avaliou-se também o tempo de vida útil do reator enzimático. Estas condições foram mantidas para os dois métodos empregados. Após estabelecidas estas variáveis, foram feitas análises em amostras de soro sanguíneo humano cujos resultados foram comparados com o método padrão (Trinder, 1954). Foram feitas também análises em medicamentos contendo ácido acetilsalicílico e comparadas com a técnica titulométrica (Farmacopéia Brasileira, 1988).

Por fim, dosou-se salicilato em soro sanguíneo empregando-se o sistema enzimático espectrofotométrico, pelo do monitoramento da alteração da absorbância em função do gás carbônico gerado na reação enzimática entre a enzima e o salicilato. Isto foi realizado após, evidentemente, estabelecidas as melhores condições.

2. Imobilizações Enzimática

Uma imobilização eficiente da enzima, sobre o suporte insolúvel com manutenção de sua integridade e estabilidade, é fundamental para o perfeito desenrolar do processo biotecnológico envolvido no método analítico empregado (Fágáin & O'Kennedy, 1991). O sucesso da imobilização enzimática depende, principalmente, das características da enzima e do suporte, do processo de imobilização e da amostra, como já citado. Assim, em função da variabilidade destes fatores, pode-se afirmar que não existe um método geral de imobilização e nem um suporte universal. Geralmente, as condições de imobilização, para cada enzima, só poderão ser estabelecidas empiricamente (Gorton et al., 1994). No entanto, a imobilização de enzimas por de ligações covalentes, utilizando-se agentes silanizantes é, atualmente, uma das técnicas mais empregadas na ligação entre o componente biológico e diversos tipos de materiais inorgânicos. A principal vantagem que esta forma de imobilização oferece é a redução da lixiviação do reagente para a solução, tendo como consequência maior durabilidade do sensor (Weetall, 1993).

2.1. Imobilização em Esferas de Vidro em Meio Aquoso

Este processo de imobilização não permitiu uma análise dentro dos valores desejados, ou seja, dentro da faixa terapêutica do salicilato ($1,1 \times 10^{-3}$ a $2,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), uma vez que a variação da absorbância obtida era muito pequena. Entretanto, verificou-se o efeito do tempo de contato entre a enzima e amostra (salicilato mais NADH) e o efeito da variação de temperatura, para averiguar se estes fatores poderiam influenciar de modo relevante a sensibilidade do método.

A amostra era injetada e transportada pelo tampão até o reator enzimático e neste ponto era cessada a vazão ("stopped-flow"), deixando-se em contato por até

dez minutos. Verificou-se que sinais maiores eram obtidos, com a mesma concentração dos reagentes, tendo sido o valor máximo entre cinco e seis minutos de residência. Em trabalhos onde a enzima *salicilato hidroxilase* é empregada na forma não imobilizada, para a determinação de salicilato, verificaram-se tempos de contato variáveis, estabelecidos para a reação se completar com posterior medida da variação da absorbância resultante do consumo de NADH, o qual é monitorado a 340 nm. Estes tempos variam entre dois (You & Bittikofer, 1984), cinco (Longenecker et al., 1984), e dez minutos (Bouvrette & Luong, 1996). Entretanto, nestes sistemas o tempo de análise empregando-se "stopped-flow" seria mais longo com diminuição da frequência de amostragem.

Avaliou-se, também, o efeito da temperatura na magnitude do sinal analítico, ou seja, verificou-se quanto de aumento de sensibilidade poderia ser obtido atingindo-se a temperatura de maior eficiência da enzima imobilizada. A faixa de temperatura estudada variou entre 20 e 40 °C, com os melhores sinais na faixa de 30 a 35 °C, havendo uma queda na magnitude do sinal com o aumento de temperatura por volta de 40 °C. O acréscimo da atividade, em decorrência do aumento da temperatura, é propriedade comum a todas reações bioquímicas e sendo 30 °C a temperatura de maior atividade da enzima *salicilato hidroxilase* livre, este comportamento era esperado. A partir de certa temperatura pode ocorrer a desnaturação protéica, com modificação das estruturas terciária e quaternária da proteína globular, fazendo com que a enzima passe de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade. Isto explicaria a queda da atividade ao redor de 40 °C.

De qualquer modo, a aplicação destas condições não promoveu um aumento da absorbância, e conseqüente aumento de sinal correspondente, suficiente para a melhoria da eficiência analítica. Assim, o reator obtido por esta técnica não foi empregado para análises subseqüentes.

2.2. Imobilização em Tubos de Náilon

A utilização de tubos de náilon como suporte para a imobilização de enzimas apresenta diversas vantagens, como a disponibilidade, custo reduzido e alta resistência como suporte. Os reatores enzimáticos tendo como suporte tubos de náilon tem sido aplicados em sistemas de fluxo para a dosagem de diversos analitos, tais como uréia, ácido úrico, glicose, creatinina, creatina, piruvato, lactato, triglicérides e colesterol (Sundaram, 1988).

A primeira etapa para o processo de imobilização empregado consistiu na liberação dos grupos reativos do polímero por ataque ácido. A hidrólise ácida promove, assim, a liberação das carboxilas e amino grupos (figura 8.1.). Posteriormente, tem-se a adição de uma solução de lisina em pH 9,0. A lisina é um aminoácido que em pH abaixo do pK_a de seu segundo aminogruppo ($pK = 10,5$) estará mais do que 50 % na forma carregada positivamente (Conn & Stumpf, 1985). Deste modo, a lisina se ligará ao grupamento carboxila, permitindo que os amino grupos fiquem livres para subseqüente ativação com glutaraldeído. Posteriormente tem-se a adição da enzima.

Entretanto, devido à dificuldade encontrada na primeira parte do processo, ou seja, na etapa relativa a liberação dos grupamentos, esta técnica não foi utilizada. A velocidade de ataque do ácido ao náilon era muito rápida (10-20 segundos), não permitindo reprodutibilidade na confecção dos reatores.

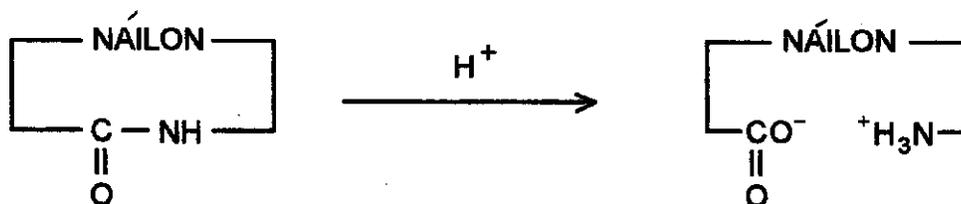


Figura 8.1. Esquema da reação do ataque ácido ao náilon. Fonte: Wingard et al., 1980

2.3. Imobilização em Esferas de Vidro usando Solvente Orgânico

Uma outra tentativa de imobilização enzimática foi realizada empregando-se esferas de vidro como suporte, entretanto, com a etapa de silanização desenvolvida em solvente orgânico.

A silanização é considerada parte crucial do processo de ligação da enzima ao suporte, sendo fundamental, não somente para a imobilização em si, mas também para a reprodutibilidade do processo (Gorton et al., 1994).

A imobilização covalente através da silanização emprega os agentes silanizantes, os quais possuem moléculas caracterizadas por possuir dois diferentes centros reativos, um deles silico-funcional e o outro orgânico funcional, ou seja, com afinidade pelo vidro e por molécula orgânica, respectivamente. O agente silanizante usado nas técnicas de imobilização empregadas neste trabalho foi o amino-propil-trietoxilano (amino-silano) em virtude de permitir uma eficiente ligação entre os reagentes. O amino-silano quando empregado para ativar a superfície de vidro, em condições anidras reage com os grupos hidroxila da superfície do vidro com uma estequiometria de 1:1 ou 1:2, produzindo neste último caso uma monocamada. Além disto, os silanos não somente se acoplam às hidroxilas do suporte, com também se ligam entre si, formando um polímero na superfície. Isto, talvez, possa explicar a maior eficiência do sensor obtido empregando-se solvente orgânico. A silanização em meio orgânico, quando comparada à realizada em meio aquoso, embora forme uma camada menos uniforme, apresenta uma capacidade de cobertura maior (Weetall, 1993).

A primeira etapa no processo, ou seja, a etapa de limpeza das esferas de vidro, também deve ser feita de forma criteriosa. É necessário que a superfície do vidro fique livre de gorduras, sujeiras, etc., e assim, os grupos silanóis (Si-OH) presentes na superfície do vidro possam reagir com o agente silanizante de modo uniforme. Os grupos silanóis capazes de reagir como o agente silanizante são os

que se encontram na forma geminal ou isolada, como representado na figura 8.2 (Cass & Ligher, 1998).

Posteriormente, tem-se a adição de glutaraldeído que permite a ligação entre o vidro ativado e a enzima. O glutaraldeído forma uma ponte entre os grupamentos aminados do suporte ativado e da enzima, o que permite separar o biocatalisador de seu suporte sólido, melhorando a acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima (Scriban, 1985). A adição do glutaraldeído ao suporte ativado promove uma alteração de cor nas esferas de vidro. Estas adquirem uma tonalidade salmão claro, o que é indicativo do sucesso das ligações. A etapa final é a adição da enzima.

O reator, assim obtido, foi escolhido para ser utilizado nas análises de salicilato. A seguir, foram determinadas as condições ideais para seu melhor desempenho, uma vez que, fatores físicos e químicos podem afetar diretamente uma reação enzimática. As enzimas possuem estruturas espaciais definidas, e variações de pH ou temperatura podem alterar seus sítios ativos com deformação da molécula e perda de atividade.

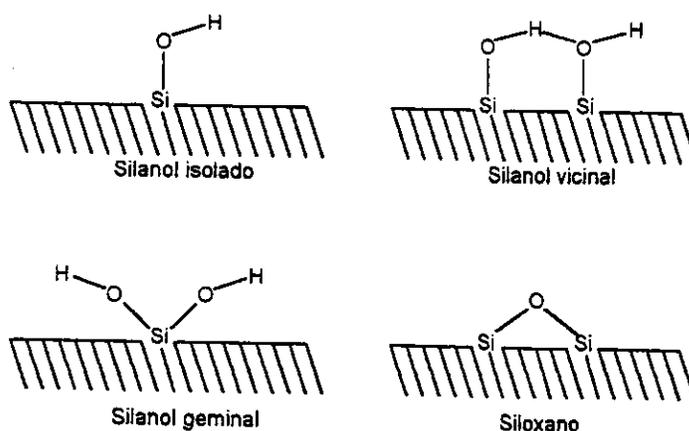


Figura 8.2. Diferentes tipos de grupos silanóis encontrados nas superfícies de vidro. Fonte: Cass & Liegler, 1998).

2.3.1. Temperatura

As reações enzimáticas se processam a valores estreitos de pH e temperatura. Assim, foram feitos testes na faixa de 20 a 40 °C, com a temperatura do sistema controlada pelo emprego de banho termostático. A enzima *salicilato hidroxilase* (E.C. 1.14.13.1) liofilizada, na sua forma livre, tem como temperatura ideal 30 °C a pH 7,6 sob as quais a atividade catalítica é máxima (Wang & Tu, 1984).

Entretanto, o reator enzimático apresentou melhor eficiência a 35 °C com queda em temperatura mais alta, como pode ser verificado no gráfico da figura 8.3. Isto pode ser explicado em função do aumento da termoestabilidade em decorrência da imobilização, sendo este fenômeno atribuído a um enrijecimento da molécula (Fágáin & O'Kenndy, 1991). O aumento de temperatura para 40 °C, provavelmente, começa a promover desnaturação protéica com queda de atividade. Contudo, optou-se por trabalhar à temperatura ambiente (25 °C) pela facilidade operacional, embora nesta temperatura a atividade seja cerca de 75 % em relação à temperatura de maior atividade (35 °C). Estes resultados são coerentes com o trabalho de Neumayr e colaboradores (Neumayr et al., 1995). Neste trabalho, empregando-se um sensor enzimático para detecção de salicilato acoplado em sistema de fluxo, foi verificado o mesmo comportamento.

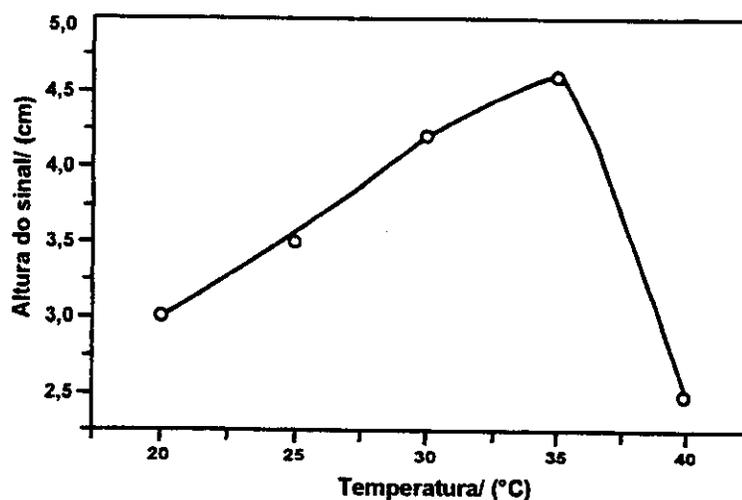


Figura 8.3. Altura de sinal (cm) versus temperatura (20, 25, 30, 35, 40 °C). [salicilato] = $1,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; vazão 0,6 mL min⁻¹; [NADH]/[salicilato] = 3:1; pH 7,6; bobina de mistura 30 cm; alça de amostragem 100 µL. (0,1 Absorbância=1 cm).

2.3.2. Relação Molar entre NADH/ Salicilato

A *salicilato hidroxilase* exige a presença da coenzima NADH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo) ou NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato) como agente redutor na catálise enzimática. Qualquer destas coenzimas pode ser utilizada, pois apresentam a mesma V_{max} , ou seja, proporcionam a mesma velocidade reacional na concentração de saturação do substrato. Normalmente, emprega-se NADH, em função de seu menor custo quando comparada com NADPH. Entretanto alguns autores (Longenecker, 1984; You & Bittikofer, 1984) alertam que algumas preparações enzimáticas podem apresentar atividade NADH oxidase, fruto de contaminações e, desta forma, pode haver interferências quando emprega-se NADH e não NADPH. No presente trabalho utilizou-se a enzima liofilizada com 98 % de pureza e não foi observada interferência quando se usou qualquer das coenzimas. Em virtude do valor inferior da coenzima NADH esta foi empregada.

A máxima conversão de salicilato pela enzima *salicilato hidroxilase* é diretamente dependente da concentração da coenzima. Diversos trabalhos pesquisados (Milagres, et al., 1997; Sotomayor, 2000; Rover et al., 2000) apresentam diferentes proporções entre NADH e salicilato, embora numa faixa de concentração de NADH superior em relação ao salicilato de até quatro vezes. Entretanto, também se observam proporções bastante superiores, como por exemplo, o trabalho de Oliveira Neto e colaboradores (Carvalho et al., 2000) que utilizaram uma relação de NADH mil vezes superior à de salicilato. Assim, é necessário estabelecer qual a melhor proporção para cada situação experimental. Foram testadas as razões molares de 1:1, 2:1, 3:1 e 4:1 de NADH/salicilato de modo a obter a melhor relação com o menor consumo possível de coenzima em virtude de seu elevado custo. De acordo com o ensaio (figura 8.4) pôde-se concluir que a melhor proporção ficou entre 3:1 e 4:1. Acima destes valores não se observou elevação do sinal sendo, portanto, a razão de 3:1 a escolhida.

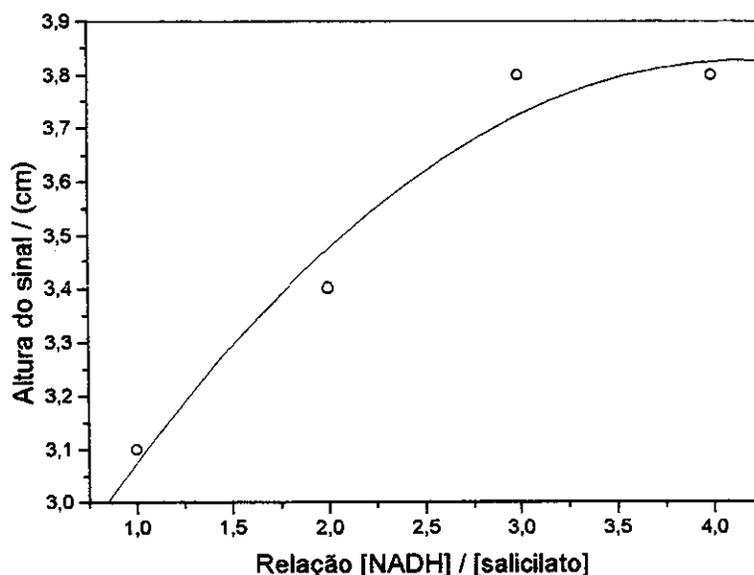


Figura 8.4. Altura do sinal (cm) versus [NADH]/[salicilato] (1:1, 2:1, 3:1 e 4:1). [salicilato]= $1,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; vazão 0,6 mL min⁻¹; temperatura 25°C; pH 7,6; bobina de mistura 30 cm; alça de amostragem 100 µL. (0,1 Absorbância= 1 cm).

2.3.3. Vazão

A vazão é um fator de elevada importância para o desenvolvimento das reações, pois permite um maior ou menor tempo de interação entre as substâncias. Na análise química em fluxo contínuo à vazão constante, o tempo de trânsito entre o injetor e o detector é exatamente o mesmo para padrões e amostras, podendo as leituras serem feitas sem a reação se completar. No entanto, obviamente, uma menor vazão oferece um tempo maior para o processamento da reação com aumento do sinal analítico. Como pode ser visualizado pela figura 8.5, quanto maior foi o tempo de contato, maior foi o sinal analítico. Entretanto, considerando-se que na análise de injeção em fluxo deve haver um compromisso entre a intensidade do sinal analítico e a frequência de amostragem, optou-se pela vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$.

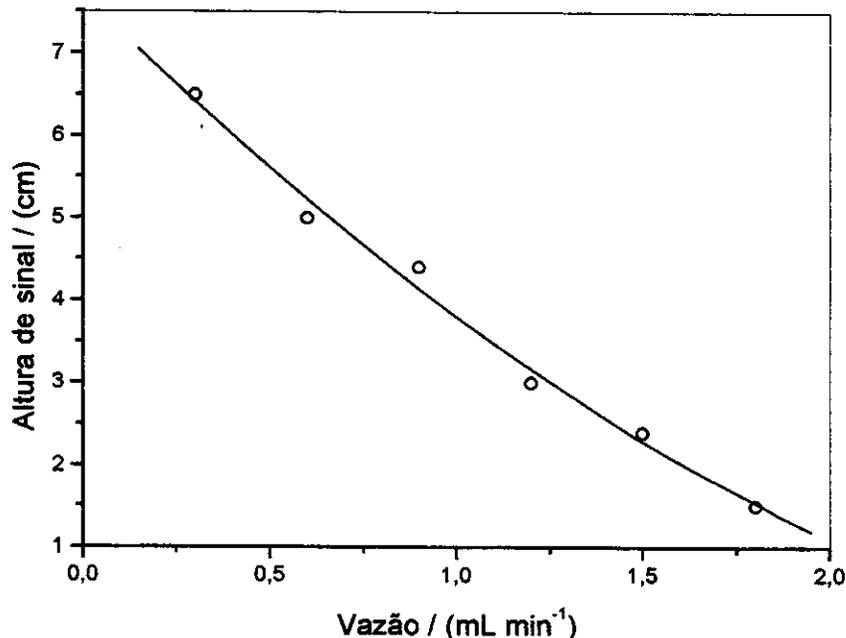


Figura 8.5. Altura do sinal (cm) versus vazão (0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8 mL min⁻¹). [salicilato] = $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; [NADH]/[salicilato] = 3:1; temperatura 25 °C; pH 7,6; bobina de mistura 30 cm; alça de amostragem 100 μL . (0,1 Absorbância = 1 cm).

2.3.4. pH

O pH de maior eficiência enzimática da enzima *salicilato hidroxilase* é de 7,6 a 30°C. Porém, em virtude da enzima estar imobilizada, este valor pode ser alterado dependendo do processo de imobilização e do suporte empregados. A faixa de pH estudada foi de 7,0 a 8,0, uma vez que a maioria das enzimas apresenta um efeito catalítico numa faixa estreita de pH. Os melhores resultados foram observados entre os valores de 7,4 a 7,8 (figura 8.6), sendo que o pH de 7,6 foi escolhido para as análises subseqüentes, pois se apresentou como o mais adequado.

A maioria dos trabalhos envolvendo a enzima *salicilato hidroxilase* emprega tampão fosfato para a manutenção do pH de maior atividade da enzima. Entretanto, Oliveira Neto e colaboradores (Rover et al., 1998-b) constataram que os íons fosfato são capazes de causar degradação da coenzima NADH em pH abaixo de 7,0, provavelmente pela formação de adutos, com degradação envolvendo oxidação do anel pentose e formação de resíduos de adenosina e adenina. Estes autores estudando outros tampões observaram, também, que íons citrato poderiam minimizar esta degradação. Assim, empregou-se tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) e tampão Macllvaine (ácido cítrico/ Na_2HPO_4) para a escolha do mais adequado. O tampão de melhor resultado foi o tampão fosfato, pois proporcionou sinais cerca de 10% mais intensos que o outro tampão, sem qualquer tipo de interferência. Esta maior eficiência talvez possa ser explicada em função da capacidade de abaixamento da energia de ativação da reação enzimática pela formação de complexos de transferência de carga entre íons fosfato e NADH, quando comparado a outros íons (Alivisatos, 1964). Assim, no presente trabalho empregou-se o tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,6). Possíveis degradações da coenzima foram evitadas pelo preparo diário das soluções de coenzima.

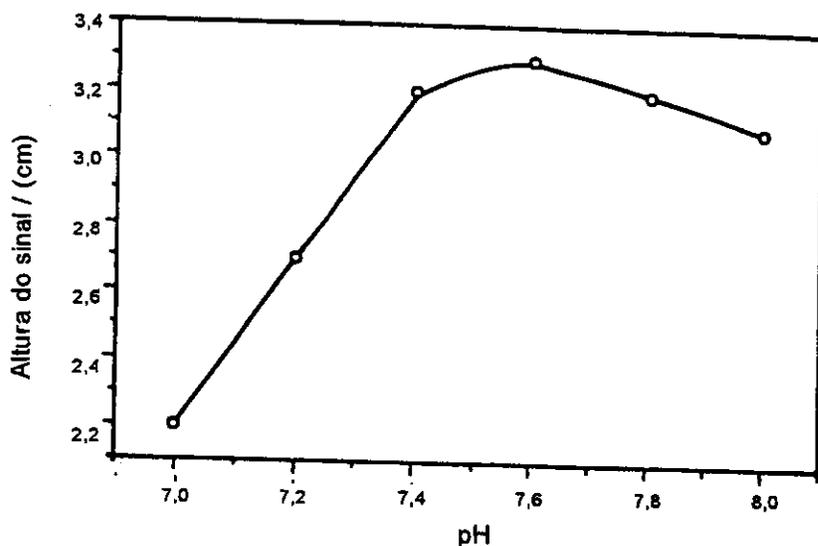


Figura 8.6. Altura de sinal (cm) versus pH (7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8; 8,0). [salicilato] = $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; vazão 0,6 mL min⁻¹; [NADH]/[salicilato] = 3:1; temperatura 25 °C; bobina de mistura 30 cm; alça de amostragem 100 µL. (0,1 Absorbância = 1 cm).

2.3.5. Tempo de Vida do Reator Enzimático e Quantidade de Enzima Empregada

A eficiência dos reatores enzimáticos e o tempo que permanecem ativos são fatores de importância, uma vez que são parâmetros determinantes para a aplicabilidade do método. Considerou-se, também, a quantidade de enzima necessária para a construção do reator.

Foram preparados reatores com 5, 10 e 15 unidades de enzima. Considera-se necessário o emprego de uma quantidade mínima entre 5 e 10 unidades de enzima (Mascini et al., 1983).

Utilizando-se 5 unidades de enzima, a sobrevida da coluna enzimática foi reduzida, com perda de 37 % de sua atividade durante as primeiras 12 horas. Após 30 dias a perda da atividade foi total. Com 10 unidades observou-se sobrevida de 30 dias, embora havendo queda de 87% de sua atividade catalítica neste período (figura 8.7). Contudo, o reator feito com 10 unidades de enzima permitiu analisar até 20 amostras (60 injeções) sem necessidade de reconstrução da curva de calibração. Com 15 unidades a atividade da coluna mostrou-se semelhante à de 10 unidades, com o mesmo tempo de vida útil. Deste modo, a quantidade de 10 unidades de enzima foi considerada adequada para a confecção dos reatores.

Um fato interessante observado foi que o reator enzimático, quando era mantido em condições adequadas (pH 7,6; 4 °C), e sem contato com amostra (salicilato e NADH), poderia suportar armazenamento por até três meses mantendo sua atividade. Entretanto, quando usado em análises, este tempo era reduzido para cerca de um mês. Isto, provavelmente, é consequência do envenenamento do reator enzimático por produtos da degradação de NADH que diminuem a vida útil do reator (Oliveira Neto et al., 1999).

Comparando-se trabalhos com a enzima *salicilato hidroxilase*, imobilizada com diversas tecnologias e diferentes suportes, observou-se, evidentemente, tempos variados de vida útil dos biossensores. Os maiores períodos de atividade foram de cerca de três meses (Neumayr et al., 1995; Ehrendorfer et al., 1996). No entanto, na grande maioria, os tempos de atividade dos sensores foram semelhantes ao obtido neste trabalho, onde se observaram tempos de 45 dias (Neumayr et al., 1993), 40 dias (Rover et al., 2000), 20 dias (Kubota et al., 1996), 15 dias (Martin & Domínguez, 1999), 10 dias (Milagres et al., 1997) e 7 dias (Sotomayor, 2000).

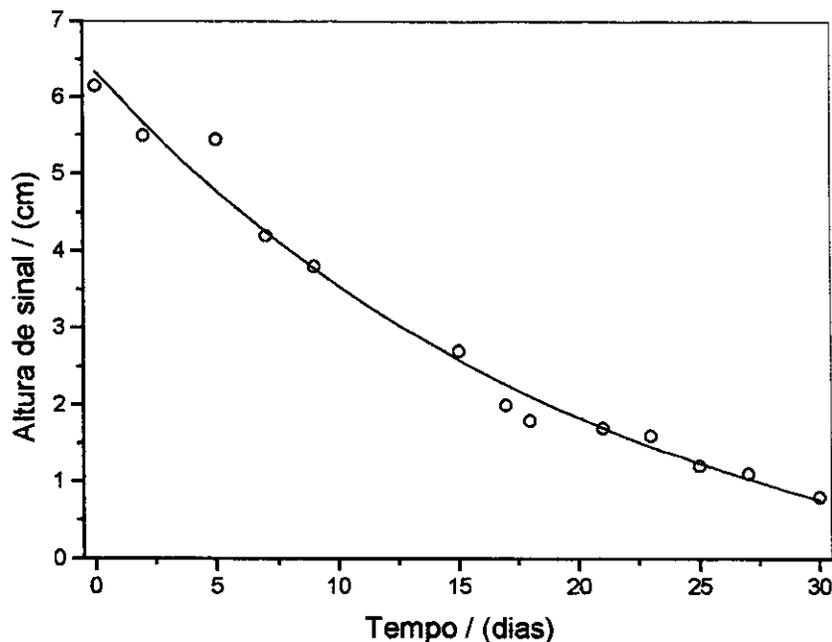


Figura 8.7. Perda da atividade enzimática do reator preparado com 10 unidades de enzima. Altura de sinal (cm) versus tempo (dias). [salicilato] = $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; vazão 0,6 mL min⁻¹; [NADH]/[salicilato] = 3:1; temperatura 25 °C; pH 7,6; bobina de mistura 30 cm; alça de amostragem 100 µL. (0,1 Absorbância= 1 cm).

3. Determinação Espectrofotométrica de Salicilato via Detecção de Catecol

Antes da análise das amostras reais (soro sanguíneo e medicamentos) foram feitos alguns ajustes no sistema em relação ao volume injetado e à bobina de reação visando melhor desempenho.

3.1. Alça de Amostragem

Verificou-se a influência do volume da alça entre 50 e 200 μL no sinal obtido. Como pode ser visto na figura 8.8, aumentando-se o volume injetado de 50 μL até 200 μL , observou-se aumento do sinal analítico. Considerando-se que o uso de maiores volumes acarreta diminuição da frequência de amostragem e aumento do tempo de limpeza do pico registrado, optou-se pela alça de injeção de amostra com volume 150 μL .

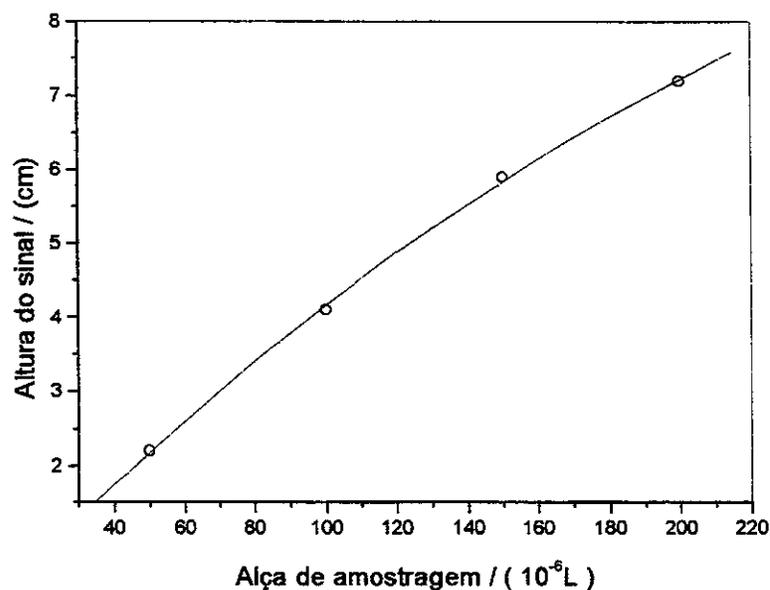


Figura 8.8. Altura do sinal (cm) versus volume de amostra (50; 100; 150; 200 μL). [salicilato] = $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; vazão 0,6 mL min^{-1} ; [NADH]/[salicilato] = 3:1; pH 7,6; temperatura 25 $^{\circ}\text{C}$; bobina de mistura 30 cm. (0,1 Absorbância= 1 cm).

3.2. Comprimento da Bobina de Mistura

A bobina de mistura é um tubo que é enrolado em torno de um cilindro de plástico rígido. É usada para melhorar a homogeneização radial em fluxos não

segmentados, de modo a promover melhores condições de mistura entre o analito e os reagentes. Explora-se um efeito conhecido como fluxo secundário, ou seja, ocorre uma movimentação circular entre o centro do tubo e as paredes, perpendicular à direção do fluxo principal, causada pela força centrífuga (Zagatto et al., 1999).

Verificou-se a influência nos sinais obtidos empregando-se bobinas de mistura com comprimentos de 30, 60, 90 e 120 cm. Avaliando-se os resultados obtidos, visualizados na figura 8.9, pôde-se concluir que a bobina de mistura de 60 cm apresentou o maior sinal. Deste modo, foi considerada a mais indicada para o método proposto.

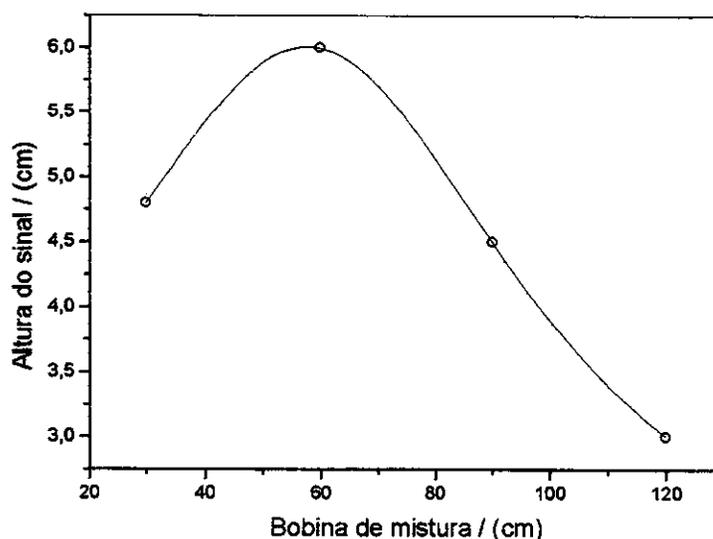


Figura 8.9. Altura do sinal (cm) versus comprimento da bobina (30; 60; 90; 120 cm). [salicilato] = $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; vazão 0,6 mL min⁻¹; [NADH]/[salicilato] = 3:1; pH 7,6; alça de amostragem 150 μ L; temperatura 25 °C. (0,1 Absorbância= 1 cm).

Com base no exposto, as condições estabelecidas para as análises subseqüentes foram: alça de amostragem de 150 μ L, bobina de reação de 60 cm, pH de 7,6, vazão de 0,6 mL min⁻¹, relação molar entre NADH/salicilato de 3:1 e temperatura de 25 °C .

3.3. Aplicações Analíticas

Muitas vezes, os autores de métodos de dosagem de salicilato alegam ser possível a aplicação dos mesmos para a determinação deste analito em fluídos biológicos em geral, sem especificar a matriz.

No caso do presente trabalho, dentre os fluídos biológicos, líquido cefalorraquidiano ou líquor, plasma, soro, sangue total e urina, a escolha pelo soro sangüíneo foi baseada em alguns critérios, como descritos abaixo.

O líquor foi descartado por não ser de absoluta necessidade. A coleta exige cuidados especiais e pode apresentar riscos para o paciente.

A urina não é recomendada em função de vários aspectos, principalmente, pelo fato que existe uma relação bastante variável entre ácido salicílico excretado e o efeito terapêutico. Além disto, a urina de indivíduos sadios apresenta fenóis e enóis alifáticos que podem reagir com o reagente de Trinder, alterando os resultados de análise. O teor destes compostos apresenta uma variação natural entre as pessoas, verificando-se grandes alterações no resultado das análises, dependendo da hora da coleta do material a ser examinado.

O sangue, normalmente, é a amostra de escolha para controle terapêutico de medicamentos. No caso da dosagem de salicilato, a utilização de sangue total não é necessária, uma vez que, somente uma porção muito pequena está ligada aos eritrócitos, mesmo na presença de altas concentrações plasmáticas do medicamento. Substâncias como fenóis e enóis alifáticos endógenos, também, como na urina, podem estar presentes, porém em menores concentrações. Por sua vez, resultados semelhantes são obtidos utilizando-se amostras de plasma (sangue colhido com anticoagulante) e soro (sangue colhido sem anticoagulante) (Moraes, 1986; Moraes & Szelwar, 1987). Assim optou-se pelo uso de soro sangüíneo, pois não exige a presença de anticoagulante que pode ser um fator de interferência.

Deste modo, em amostras de soro sanguíneo foram adicionadas soluções padrão de salicilato para obtenção das concentrações desejadas. A adição de salicilato foi feita tendo-se o cuidado de não se variar o volume adicionado de solução à amostra.

Nos testes iniciais verificou-se que apenas a injeção do soro (sem salicilato adicionado) no sistema promovia um sinal de tal grandeza que interferia muito nos resultados. Concluiu-se que isto ocorria devido às diferenças de viscosidade entre amostra, transportador e reagentes. As variações de viscosidade entre diferentes substâncias (soluções aquosas, sangue, soro, plasma, etc.) são significativas em sistemas de fluxo, podendo gerar interferências (Wilding et al., 1994). Estas diferenças ocasionariam a formação de gradientes de índice de refração promovendo o fenômeno chamado efeito "Schlieren" (Rocha & Nóbrega, 1996).

A solução do problema foi conseguida pela introdução, antes da entrada da amostra no espectrofotômetro, de um tubo de diâmetro um pouco superior aos do sistema, recheado de lã de vidro. A amostra, após passar previamente pela bobina de mistura chega a esta coluna, e é obrigada a passar entre as fibras da lã de vidro promovendo uma última homogeneização. Esta medida foi suficiente para a minimizar o efeito "Schlieren", permitindo as análises de soro. O cuidado adicional em relação a esta coluna de lã de vidro é a necessidade de troca periódica, para se evitar problemas de compactação da lã de vidro.

3.3.1. Curva de Calibração e Análise de Recuperação

A curva de calibração foi obtida pela medida, em triplicata, de soluções padrão de salicilato na faixa de $5,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. O gráfico da curva de calibração correspondente pode ser visualizado na figura 8.10 e o diagrama na figura 8.11. A curva de calibração obtida obedece a seguinte equação: $h = 0,375 + 28,0 \times 10^2 C - 11,7 \times 10^4 C^2$ com um coeficiente de correlação de 0,998 para n (número de amostras) igual a 11. Nesta equação, h representa a altura dos picos

em cm e C a concentração de salicilato em mol L⁻¹. A não linearidade da curva obtida pode ser atribuída à incompleta conversão do salicilato a catecol, em função de saturação dos sítios catalíticos disponíveis. Para facilidade de cálculo pode-se, a partir dos mesmos dados, obter uma reta, com a seguinte equação $h = 0,814 + 22,2 \times 10^2 C$, com coeficiente de correlação de 0,996 para n igual a 11. O limite de detecção foi $0,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ nas condições estabelecidas e a frequência de amostragem igual a 15 análises por hora.

Foi feita análise de recuperação de salicilato adicionado à matriz (soro sanguíneo). Os resultados estão indicados na tabela 8.1. Os valores de recuperação calculados usando-se a curva de segundo grau indicaram menor desvio padrão, entretanto, foram bastante próximos, podendo ser aplicada qualquer uma das equações apresentadas. A porcentagem média de recuperação obtida pela equação de segundo grau foi de 99,7 % com precisão de 3,4 %. Os valores apresentados pela equação de primeiro grau indicaram uma recuperação média de 100,1 % com precisão de 8,2 %.

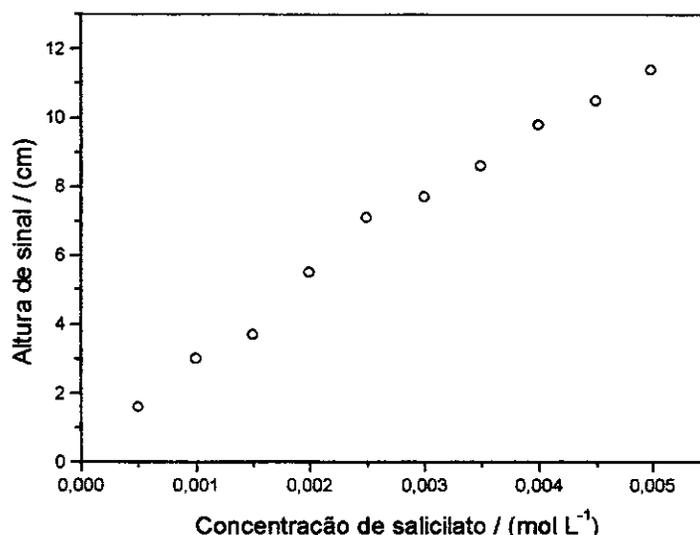


Figura 8.10. Curva de calibração. Altura de sinal (cm) versus concentração de salicilato (mol L⁻¹). Vazão 0,6 mL min⁻¹; alça de amostragem 150 µL; bobina de mistura 60 cm; [NADH]/[salicilato] = 3:1; pH 7,6; temperatura 25 °C. (0,1 Absorbância= 1 cm).

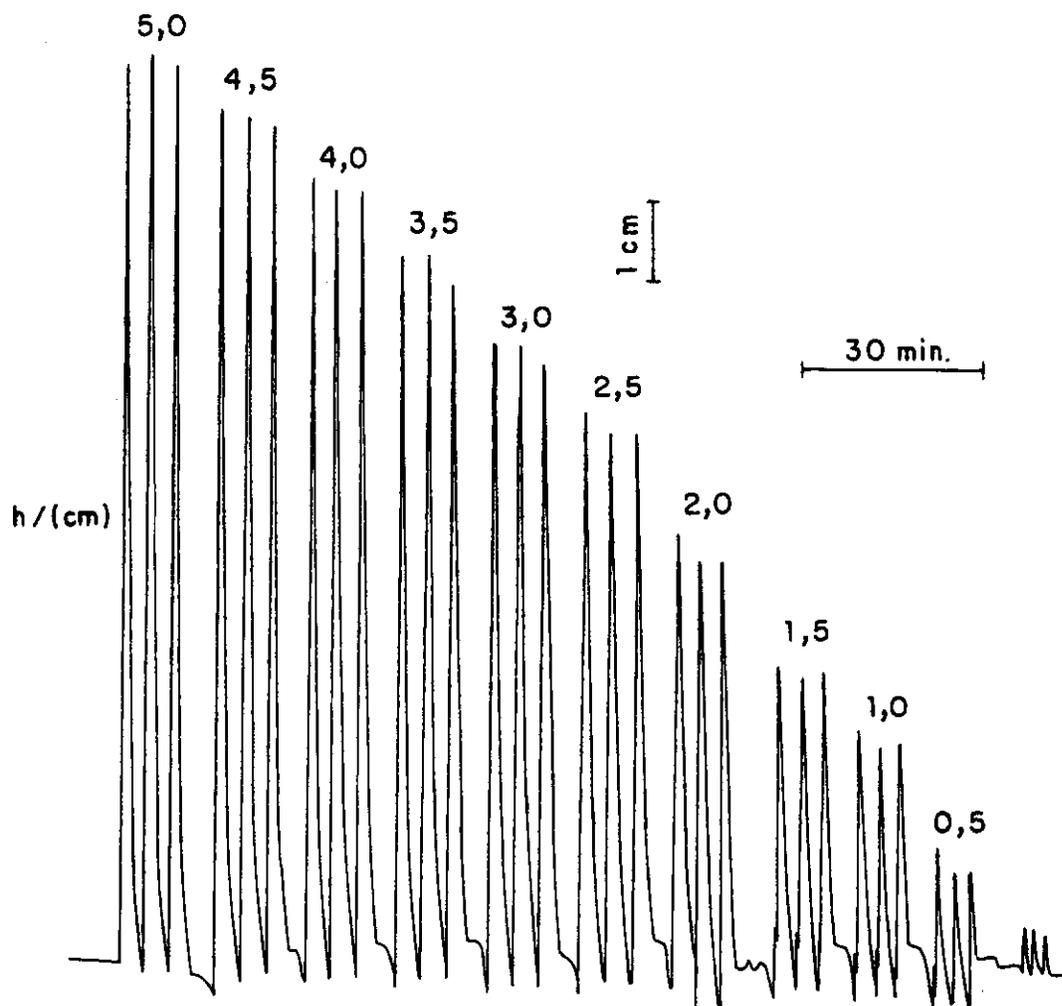


Figura 8.11. Diagrama da determinação de salicilato por detecção de catecol. Da esquerda para a direita, sinais em triplicata de padrões de salicilato (5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5 $\times 10^{-3}$ mol L⁻¹). Vazão 0,6 mL min⁻¹; alça de amostragem 150 μ L; bobina de mistura 60 cm; [NADH]/[salicilato] = 3:1; pH 7,6; temperatura 25 °C. (0,1 Absorbância = 1 cm).

Tabela 8.1. Recuperação de salicilato em amostras de soro pelo método enzimático^a.

Amostras	Sinal / (cm)	Salicilato adicionado / 10 ⁻³ mol L ⁻¹	Salicilato encontrado ¹ / 10 ⁻³ mol L ⁻¹	Recuperação ¹ / (%)	Salicilato encontrado ² / 10 ⁻³ mol L ⁻¹	Recuperação ² / (%)
1	11,47±0,25	5,00	4,98±0,14	99,5±2,8	4,79±0,14	95,8±2,8
2	10,76±0,45	4,50	4,59±0,25	101,0±5,6	4,49±0,20	100,4±4,6
3	9,86±0,21	4,00	4,08±0,14	102,1±3,5	4,08±0,10	102,1±2,4
4	8,73±0,17	3,50	3,50±0,14	99,9±4,0	3,57±0,09	102,1±2,7
5	7,63±0,12	3,00	2,97±0,07	99,0±2,5	3,08±0,07	102,6±2,2
6	6,80±0,22	2,50	2,58±0,12	103,2±5,0	2,70±0,12	108,4±4,8
7	5,66±0,25	2,00	2,07±0,13	103,3±6,6	2,19±0,14	109,5±6,9
8	4,06±0,06	1,50	1,39±0,02	92,4±1,5	1,47±0,02	98,0±1,5
9	3,10±0,10	1,00	1,00±0,04	99,7±3,8	1,03±0,05	103,0±4,5
10	1,70±0,17	0,50	0,48±0,07	96±14	0,40±0,08	80±17
Média±desvio padrão				99,7±3,4		100,1±8,2

a- Determinação de salicilato por detecção de catecol. Condições do experimento: pH 7,6; temperatura 25 °C; vazão 0,6 mL min⁻¹ ; [NADH]/[salicilato] 3:1; alça de amostragem 150µL; bobina de reação de 60 cm.

1-calculado pela equação de segundo grau.

2-calculado pela equação de primeiro grau.

3.3.2. Comparação do Método Enzimático com Determinação via Detecção de Catecol com o Método de Trinder

O método de Trinder (Trinder, 1954) é considerado como padrão para a dosagem de salicilatos, como já mencionado. O uso do reagente de Trinder pode estar associado com cloreto mercúrico (Moraes & Sznelwar, 1987; King et al., 1995;) ou não (Keller, 1947; Koupparis & Anagnostopolou, 1988; Karicek et al., 1996;). Procurou-se então, verificar qual a seria a melhor opção para os experimentos.

O reagente de Trinder utiliza cloreto mercúrico para a precipitação de proteínas. Para a remoção das proteínas precipitadas, deve-se centrifugar a amostra para posterior leitura. Evitando-se o uso do cloreto mercúrico tem-se menor manipulação da amostra, mais rapidez e evita-se o uso de substância poluente. Assim, em função de não terem sido observadas diferenças significativas nos resultados e pela simplicidade do método, optou-se pelo emprego do reagente de Trinder sem cloreto mercúrico.

Para a análise estatística, entre os resultados obtidos pelo método proposto e pelo método de Trinder (Trinder, 1954), empregou-se o teste *t* de Student (Eckschlager, 1972) e o teste F (Skoog et al., 1996). O teste *t* é usado para verificar se a diferença entre as médias dos conjuntos de dados é significativa ou não, considerando, no caso, o nível de significância ou confiança de 5 % ($\alpha = 0,05$). Resumidamente, pode-se dizer que este teste é utilizado para verificar a concordância entre os métodos analíticos. O teste F serve para comparar os dois conjuntos de dados em termos de seus desvios padrão, tendo em vista indicar se a precisão dos métodos é semelhante. Neste teste, também foi utilizado o mesmo nível de significância.

Os resultados apresentados na tabela 8.2 indicaram boa correlação entre os valores obtidos pelos dois métodos. A figura 8.12 apresenta o diagrama das análises realizadas pelo método enzimático.

Tabela 8.2. Comparação entre os resultados obtidos pelo método de Trinder e o método enzimático^a, usando o teste estatístico *t* de Student e o teste F.

O valor de *t* tabulado é 2,776 para $\nu = 4^*$ e $\alpha = 0,05^{***}$.

O valor de F tabulado é 19,00 para $\nu = 2^{**}$ e $\alpha = 0,05^{***}$.

Amostras	Trinder (1×10^{-3} mol L ⁻¹)	Enzimático ^a (1×10^{-3} mol L ⁻¹)	Valor calculado de <i>t</i>	Valor calculado de F
1	2,45 ± 0,03	2,46 ± 0,04	0,028	0,17
2	1,31 ± 0,07	1,30 ± 0,08	1,667	1,31
3	2,42 ± 0,04	2,39 ± 0,25	0,168	3,91
4	6,06 ± 0,12	5,78 ± 0,20	1,698	2,78
5	4,62 ± 0,02	4,57 ± 0,27	0,261	7,29
6	2,05 ± 0,05	1,90 ± 0,17	1,198	5,90
7	2,25 ± 0,04	2,18 ± 0,03	2,473	1,78
8	4,21 ± 0,10	4,09 ± 0,12	1,086	1,44
9	0,96 ± 0,05	0,86 ± 0,03	2,425	2,78
10	2,43 ± 0,01	2,37 ± 0,04	2,069	1,78

a- Determinação de salicilato por detecção de catecol. Condições do experimento: pH 7,6; temperatura 25 °C; vazão 0,6 mL min⁻¹; [NADH]/[salicilato] = 3:1; alça de amostragem 150µL, bobina de reação de 60 cm. (0,1 Absorbância= 1 cm).

* ν é o grau de liberdade ($n_a + n_b - 2$), onde n_a é igual ao número de determinações do método enzimático (3) e n_b é igual ao número de determinações do método titulométrico (3).

** ν é o grau de liberdade ($n-1$), onde n é igual a 3 determinações.

*** limite de confiança.

Os valores de t (Skoog, et al., 1996) e F (Eckschlager, 1972) foram calculados segundo as equações apresentadas abaixo:

Equação para cálculo do valor de t , tendo o número de determinações iguais nos dois procedimentos ($n_A = n_B = n$):

$$t = \frac{\bar{X}_A - \bar{X}_B}{\sqrt{\frac{S_A^2 + S_B^2}{n-1}}}$$

onde:

$$\left\{ \begin{array}{l} \bar{X}_A = \text{média aritmética de A} \\ \bar{X}_B = \text{média aritmética de B} \\ S_A = \text{desvio padrão de A} \\ S_B = \text{desvio padrão de B} \\ n = \text{número de determinações} \end{array} \right.$$

Equação para cálculo do valor de F :

$$F = S_A^2 / S_B^2$$

onde:

$$\left\{ \begin{array}{l} S_A = \text{desvio padrão de A} \\ S_B = \text{desvio padrão de B} \end{array} \right.$$

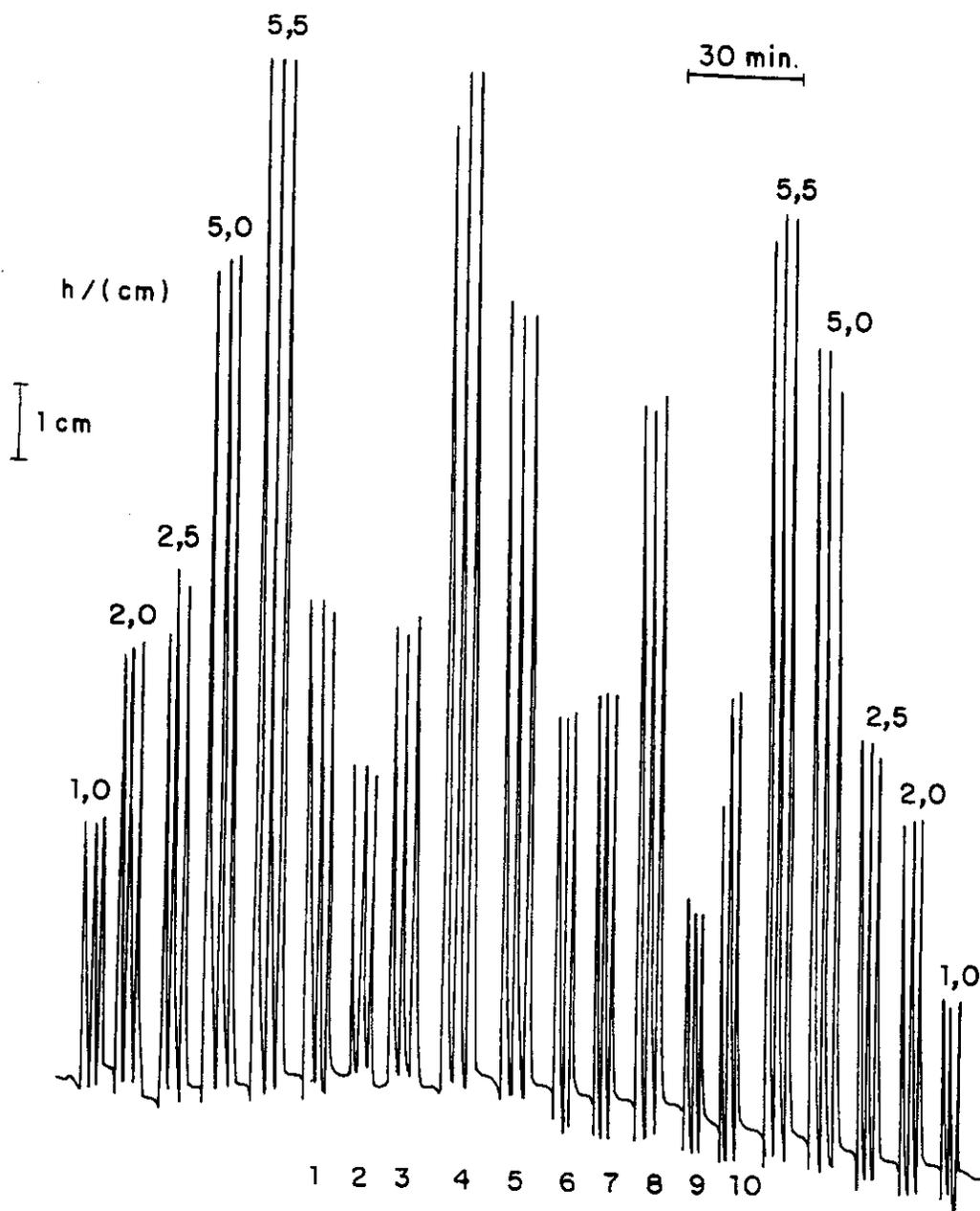


Figura 8.12. Diagrama das análises de soro pelo método enzimático por detecção de catecol. Da esquerda para a direita, sinais em triplicata de padrões de salicilato ($1,0; 2,0; 2,5; 5,0; 5,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) intercalando-se as amostra de soro com salicilato. Vazão $0,6 \text{ mL min}^{-1}$; alça de amostragem $150 \mu\text{L}$; bobina de mistura 60 cm ; $[\text{NADH}]/[\text{salicilato}] = 3:1$; pH $7,6$; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$. ($0,1 \text{ Absorbância} = 1 \text{ cm}$). Equação $h = 1,4717 + 2060,72 \times C$; $R = 0,996$.

3.3. Análise de Medicamentos

Embora o método para determinação de salicilato pela formação de catecol tenha sido inicialmente proposto para a dosagem de salicilato em soro sanguíneo, visualizou-se a possibilidade da análise de amostras de medicamentos. Foi feita a comparação com o método que é indicado pela Farmacopéia Brasileira (Farmacopéia Brasileira, 1988). Os resultados obtidos pelos métodos empregados foram analisados pelo teste *t* de Student (Eckschlager, 1972) e teste F (Skoog et al., 1996). Observou-se concordância entre os valores apresentados pelas duas técnicas, como pode ser visto na tabela 8.3. Porém, a vantagem do sistema proposto reside na rapidez e facilidade nas dosagens, o que vem a ser interessante quando existir grande demanda de análises.

Tabela 8.3. Comparação entre os resultados obtidos pelo método enzimático^a e o método titulométrico^b usando o teste estatístico *t* de Student e o teste F, na dosagem de ácido acetilsalicílico em medicamentos.

O valor de *t* tabulado é 2,776 para $\nu = 4^*$ e $\alpha = 0,05^{***}$
 O valor de F tabulado é 19,00 para $\nu = 2^{**}$ e $\alpha = 0,05^{***}$

Amostras	Conteúdo indicado / (mg)	Conteúdo ^a determinado / (mg)	Conteúdo ^b determinado / (mg)	Valor calculado de <i>t</i>	Valor calculado de F
1	500,0	503,1 ± 0,8	501,2 ± 0,8	1,666	3,06
2	500,0	499,0 ± 1,3	500,1 ± 0,5	1,117	6,76
3	500,0	502,3 ± 1,4	501,0 ± 0,9	1,104	2,06
4	100,0	103,0 ± 2,7	102,6 ± 0,9	0,199	9,00

a- Determinação de salicilato por detecção de catecol. Condições do experimento: pH 7,6; temperatura 25 °C; vazão 0,6 mL min⁻¹, [NADH]/[salicilato] = 3:1, alça de amostragem 150 µL, bobina de reação de 60 cm. (0,1 Absorbância = 1 cm).

b- Método Titulométrico (Farmacopéia Brasileira, 1988)

* ν é o grau de liberdade ($n_a + n_b - 2$), onde n_a é igual ao número de determinações do método enzimático (3) e n_b é igual ao número de determinações do método titulométrico (3).

** ν é o grau de liberdade ($n-1$), onde n é igual a 3 determinações.

*** limite de confiança

4. Determinação Espectrofotométrica de Salicilato via Detecção de Gás Carbônico

O gás carbônico formado na reação enzimática permeia pela membrana de silicona, sendo recebido por uma solução do indicador púrpura de bromocresol, o qual tem seu pH alterado com mudança da cor. A variação da absorbância é proporcional ao logaritmo da concentração do analito (Barros, 1990).

Este indicador apresenta intervalo de transição de coloração numa faixa de pH ente 4,8 a 7,2. Na sua forma ácida apresenta coloração amarela e na sua forma básica coloração púrpura (Bishop, 1972). A figura 8.13 apresenta a estrutura ácida do púrpura do bromocresol. O pH da solução foi ajustado para 7,0, pois nesta faixa pequenas variações hidrogeniônicas resultam em grandes variações de pH.

Sistemas de injeção em fluxo envolvendo difusão gasosa empregam, em grande parte, membranas de Teflon® (PTFE – politetrafluoroetileno), embora a membrana de borracha de silicona também apresente bons resultados (Calatayud, 1996). Neste trabalho, inicialmente foram empregadas fitas de Teflon® de diferentes marcas e lotes, comercialmente disponíveis. Entretanto, com esta membrana a reprodutibilidade dos resultados não se apresentava satisfatória. Na tentativa de solucionar os problemas, além de cuidados na colocação da fita, adotou-se a sucção do fluxo. Adaptou-se o fluxo de saída à bomba peristáltica, de modo a facilitar permeação do gás e evitar as interferências que estavam sendo observadas. Entretanto, os resultados não foram satisfatórios e assim, escolheu-se usar uma membrana de borracha de silicona em virtude da maior homogeneidade e resistência, observadas quando comparadas com as fitas de Teflon®. A não uniformidade destas membranas de Teflon® pode promover alterações de respostas significativas. Tryzell e Karlberg (Tryzell & Karlberg, 1995) estudando diferentes membranas de Teflon® concluíram que a falta de homogeneidade nas membranas pode gerar diferenças de respostas da ordem de até 19 %. A

membrana de borracha de silicona foi preparada conforme descrito anteriormente, obtendo-se uma espessura de 100 micra.

Para ajuste de condições deste sistema estudou-se a influência da vazão, do volume de amostra, da concentração de ácido sulfúrico e do comprimento da bobina de reação. As condições de melhor desempenho da coluna enzimática, determinadas anteriormente, em relação a: temperatura, relação molar entre NADH/salicilato e pH foram mantidas. Posteriormente, analisou-se amostras de soro.

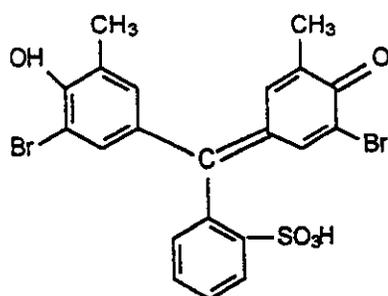


Figura 8.13. Representação da estrutura do púrpura de bromocresol na sua forma ácida.
Fonte: Bishop, 1972

4.1. Alça de Amostragem

A quantidade de amostra empregada deve ser verificada, uma vez que pode ocorrer a saturação da coluna enzimática, ou seja, pode não haver sítios catalíticos disponíveis para que a reação entre salicilato e a *salicilato hidroxilase* se desenvolva por completo. A quantidade de amostra estudada compreendeu uma faixa entre 150 μL e 500 μL . Pôde-se observar um crescente aumento até 450 μL (figura 8.14). Para evitar consumo elevado de amostra e longo tempo de análise, optou-se pela alça de amostragem de 250 μL .

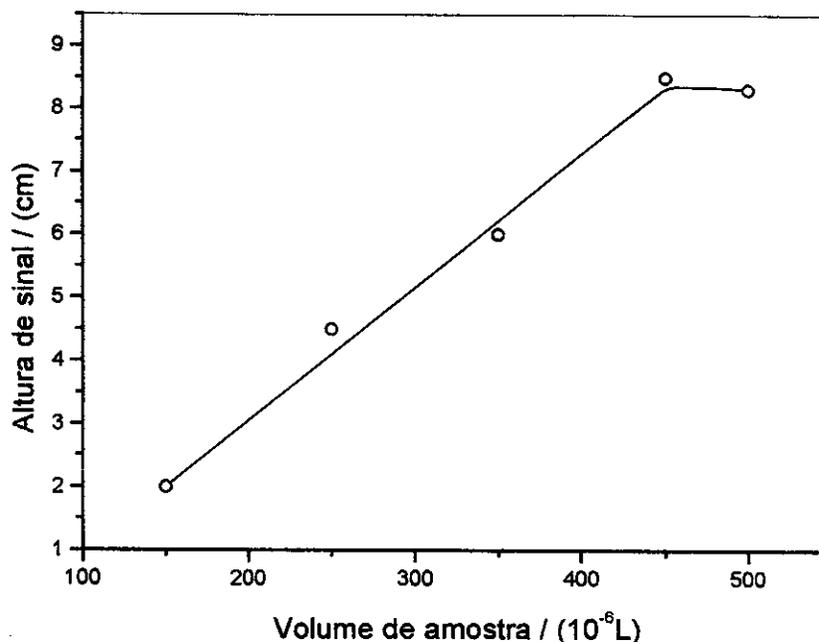


Figura 8.14. Altura de sinal (cm) versus volume de amostra (150; 250; 350; 450; 500 μL). [salicilato]= $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} ; vazão 0,6 mL min^{-1} ; [NADH]/[salicilato]=3:1; temperatura 25°C; pH 7,6; bobina de mistura 35 cm; $[\text{H}_2\text{SO}_4]=1,0$ mol L^{-1} . (0,1 Absorbância = 1 cm).

4.2. Vazão

Como era de se esperar, a altura dos picos variou de modo significativo de acordo com a vazão empregada. Os valores mais elevados de vazão não permitem uma hidrólise completa do salicilato, uma vez que o tempo de contato entre enzima e o substrato é um fator de suma importância para que ocorra a reação. Além disto, pode ocorrer uma diminuição da permeação do gás carbônico através da membrana com o aumento da vazão. A figura 8.15 apresenta os resultados obtidos. A vazão escolhida foi de 0,6 mL min^{-1} para um sinal adequado e ao mesmo tempo uma boa frequência analítica.

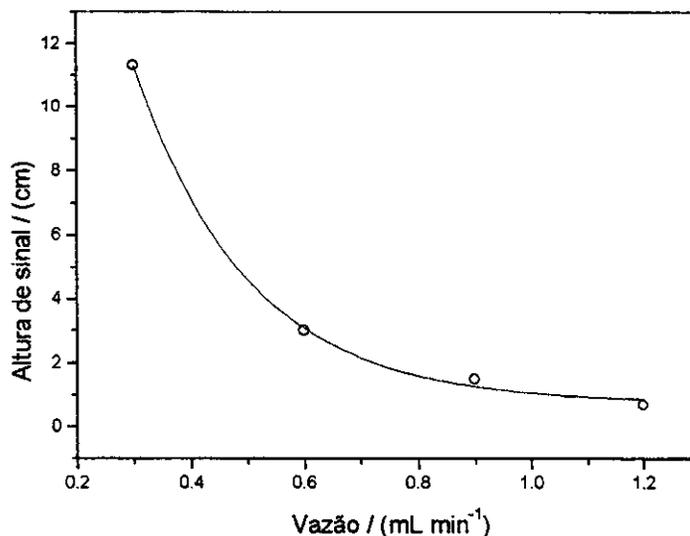


Figura 8.15. Altura de sinal (cm) versus vazão (0,3; 0,6; 0,9; 1,2 mL min⁻¹). [salicilato]= 1,0×10⁻³ mol L⁻¹; alça de amostragem 250 μL; [NADH]/[salicilato]=3:1; temperatura 25 °C; pH 7,6; bobina de mistura 35 cm; [H₂ SO₄]=1,0 mol L⁻¹. (0,1 Absorbância = 1 cm).

4.3. Comprimento da Bobina de Mistura

Verificou-se a influência na altura dos sinais utilizando-se bobinas de 30, 35, 40, 45, 50 cm de comprimento. Avaliando-se os resultados obtidos, que podem ser visualizados no gráfico da figura 8.16, pôde-se concluir que a bobina de mistura de 45 cm apresentou o melhor sinal quando comparada com as demais. Deste modo, foi considerada a mais indicada para o método proposto.

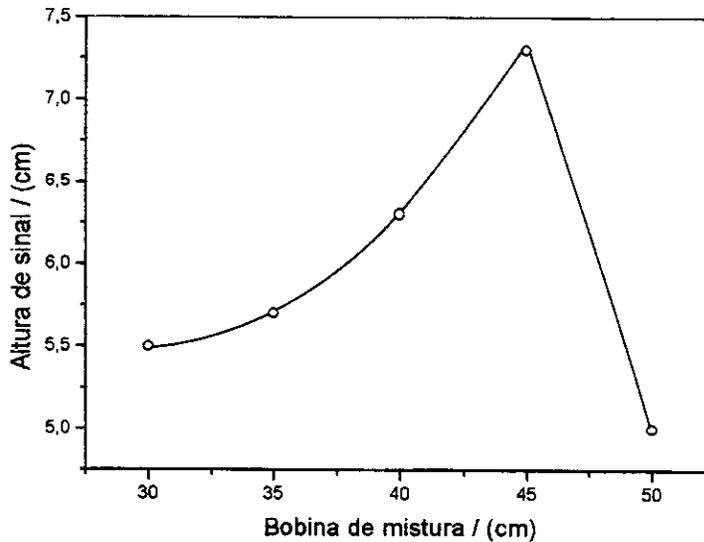


Figura 8.16. Altura de sinal (cm) versus bobina de mistura (30, 35, 40, 45, 50 cm). [salicilato]= $1,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; vazão 0,6 mL min⁻¹; volume de amostra 250 μ L; [NADH]/[salicilato]=3:1; temperatura 25°C; pH 7,6; [H₂SO₄]=1,0 mol L⁻¹. (1 cm = 0,1 Absorbância).

4.4. Concentração de Ácido Sulfúrico

O pH de maior atividade da enzima *salicilato hidroxilase* é de 7,6. Em vista disto, a reação deve se desenvolver em meio tamponado em pH adequado. No entanto, é necessário diminuir o pH do meio contendo o produto da reação, para evitar que o gás CO₂ formado possa ficar na forma de HCO₃⁻. Deste modo, a confluência onde se misturam a solução contendo os produtos da reação com a solução de H₂SO₄, é colocada após a coluna enzimática, de modo a evitar o contato da enzima com a solução de ácido sulfúrico, pois isto causaria a imediata desnaturação da enzima.

Foram estudadas as influências das concentrações do ácido sulfúrico de 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mol L⁻¹. Os resultados indicaram (figura 8.17) que após a

concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ não há incremento do sinal e, portanto, esta foi a concentração empregada.

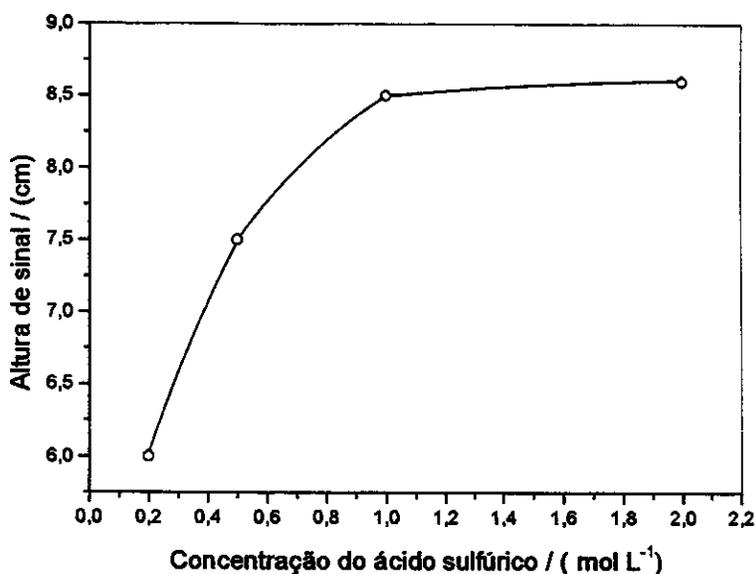


Figura 8.17. Altura de sinal (cm) versus concentração de ácido sulfúrico (0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mol L⁻¹). [salicilato]= $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; alça de amostragem 250 μL ; [NADH]/[salicilato]=3:1; temperatura 25 °C; vazão 0,6 mL min⁻¹; pH 7,6; bobina de mistura 45 cm. (0,1 Absorbância= 1 cm).

Assim, as condições estabelecidas neste sistema foram: volume de amostra de 250 μL , vazão de 0,6 mL min⁻¹, bobina de reação de 45 cm e concentração de ácido sulfúrico de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. A seguir, os testes foram feitos com amostras de soro sanguíneo.

4.5. Aplicações Analíticas

A capacidade de impedir mudanças bruscas de pH é uma propriedade importante dos organismos biológicos. Os fluidos intra e extracelulares do organismo dos mamíferos mantêm-se estabilizado devido à capacidade tampão dos mesmos. O principal tampão extracelular no sangue dos vertebrados é o

sistema tampão de bicarbonato ($\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{HCO}_3^-$). Assim, é necessária a eliminação do "ácido carbônico", antes da dosagem de salicilato pelo método proposto (via detecção de gás carbônico) para se evitar interferências. Isto foi feito pela adição de 0,5 mL de solução de ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em 1mL de soro, agitação e, a seguir, adição de 0,5 mL de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) para retorno do pH original. Posteriormente, as amostras foram dopadas com soluções padrão de salicilato de sódio, de modo a obter as concentrações desejadas.

4.5.1. Curva Analítica e Análise de Recuperação

Para a curva de calibração foram feitas medidas em triplicatas de soluções padrão de salicilato na faixa de $5,0 \times 10^{-3}$ a $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (figuras 8.18 e 8.19). A curva de calibração obedeceu a seguinte equação: $h = 0,923 + 36,2 \times 10^2 \times C$ para 5 concentrações com 3 determinações cada, com coeficiente de relação de 0,998. Nesta equação, h representa a altura de pico em centímetros e C a concentração de salicilato em mol L^{-1} .

Foram feitos testes de recuperação de salicilato adicionando-se quantidades conhecidas de padrão de salicilato em soro sangüíneo, com uma recuperação média de 101,3 % e precisão média de 4,9 % (tabela 8.4). A taxa de amostragem foi de 15 amostras por hora com limite de detecção de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

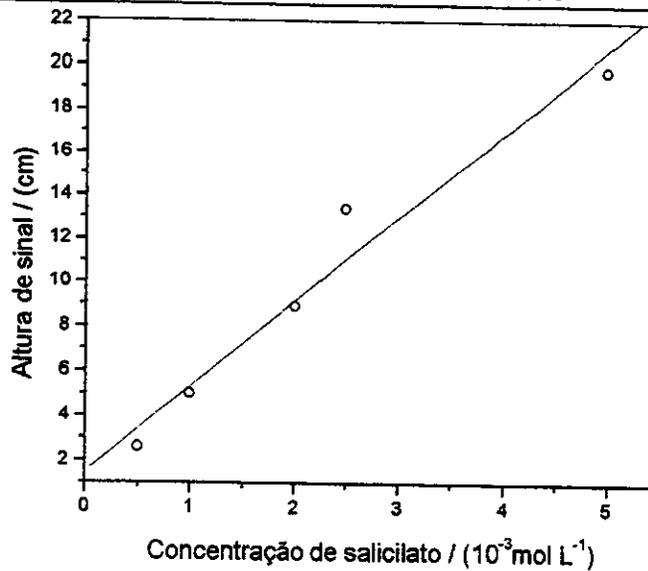


Figura 8.18. Curva de calibração. Altura de sinal (cm) versus concentração de salicilato ($5,0; 3,0; 2,0; 1,0; 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Vazão $0,6 \text{ mL min}^{-1}$; alça de amostragem $250 \mu\text{L}$; $[\text{NADH}]/[\text{salicilato}]=3:1$; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; pH $7,6$; bobina de mistura 45 cm ; $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 1,0 \text{ mol L}^{-1}$. ($0,1 \text{ Absorbância} = 1 \text{ cm}$).

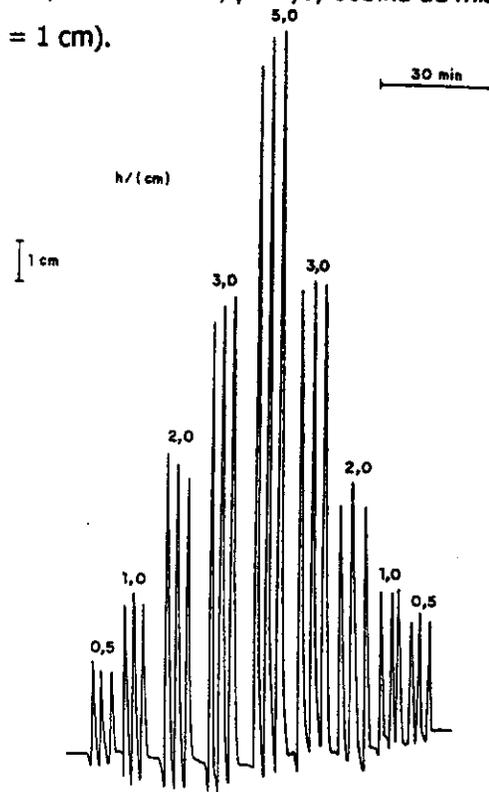


Figura 8.19. Diagrama da determinação de salicilato por detecção de gás carbônico. Da esquerda para a direita sinais em triplicata de padrões de salicilato ($5,0; 3,0; 2,0; 1,0; 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Vazão $0,6 \text{ mL min}^{-1}$; alça de amostragem $250 \mu\text{L}$; $[\text{NADH}]/[\text{salicilato}]=3:1$; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; pH $7,6$; bobina de mistura 45 cm ; $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 1,0 \text{ mol L}^{-1}$. ($0,1 \text{ Absorbância} = 1 \text{ cm}$).

Tabela 8.4. Recuperação de salicilato em amostras de soro pelo método enzimático^a.

Amostras	Salicilato adicionado / (10^{-3} mol L⁻¹)	Altura do sinal / (cm)	Salicilato encontrado / (10^{-3} mol L⁻¹)	Recuperação / (%)
1	5,00	18,90 ± 0,26	4,91 ± 0,18	98,2
2	4,50	17,17 ± 0,46	4,49 ± 0,20	99,8
3	4,00	15,47 ± 0,15	4,02 ± 0,05	100,5
4	3,50	13,50 ± 0,10	3,48 ± 0,03	99,4
5	3,00	11,60 ± 0,10	2,95 ± 0,03	98,3
6	2,50	9,53 ± 0,21	2,38 ± 0,06	95,2
7	2,00	8,27 ± 0,40	2,03 ± 0,11	101,5
8	1,50	6,83 ± 0,40	1,63 ± 0,11	108,7
9	1,00	4,93 ± 0,15	1,10 ± 0,04	110,0
Média ± desvio				
padrão				101,3 ± 4,9

a- Método de determinação de salicilato através da detecção de gás carbônico. Condições do experimento: Vazão 0,6 mL min⁻¹; alça de amostragem 250 µL; [NADH]/[salicilato]=3:1; temperatura 25 °C; pH 7,6; bobina de mistura 45 cm; [H₂SO₄] = 1,0 mol L⁻¹. (0,1 Absorbância = 1 cm).

4.5.2. Comparação Método Enzimático com Determinação via Detecção de Gás Carbônico com o Método de Trinder

Foram realizadas dosagens em soro e comparados ao método de Trinder (Trinder, 1954). A figura 8.20 mostra o fiagrama obtido na análise das amostras de soro. Analisando os valores "t de Student" (Eckslager, 1972) calculados (tabela 8.5), observou-se que todos estão abaixo do valor tabelado $t = 2,776$ para $v = 4$ e $\alpha = 0,05$, portanto há uma boa concordância entre os métodos.

O teste F (Skoog et al., 1996) foi aplicado para verificar a precisão entre os métodos. Neste teste também foi utilizado o mesmo nível de significância e pelos dados analisados (tabela 8.5), pode-se considerar que existe adequada concordância entre eles.

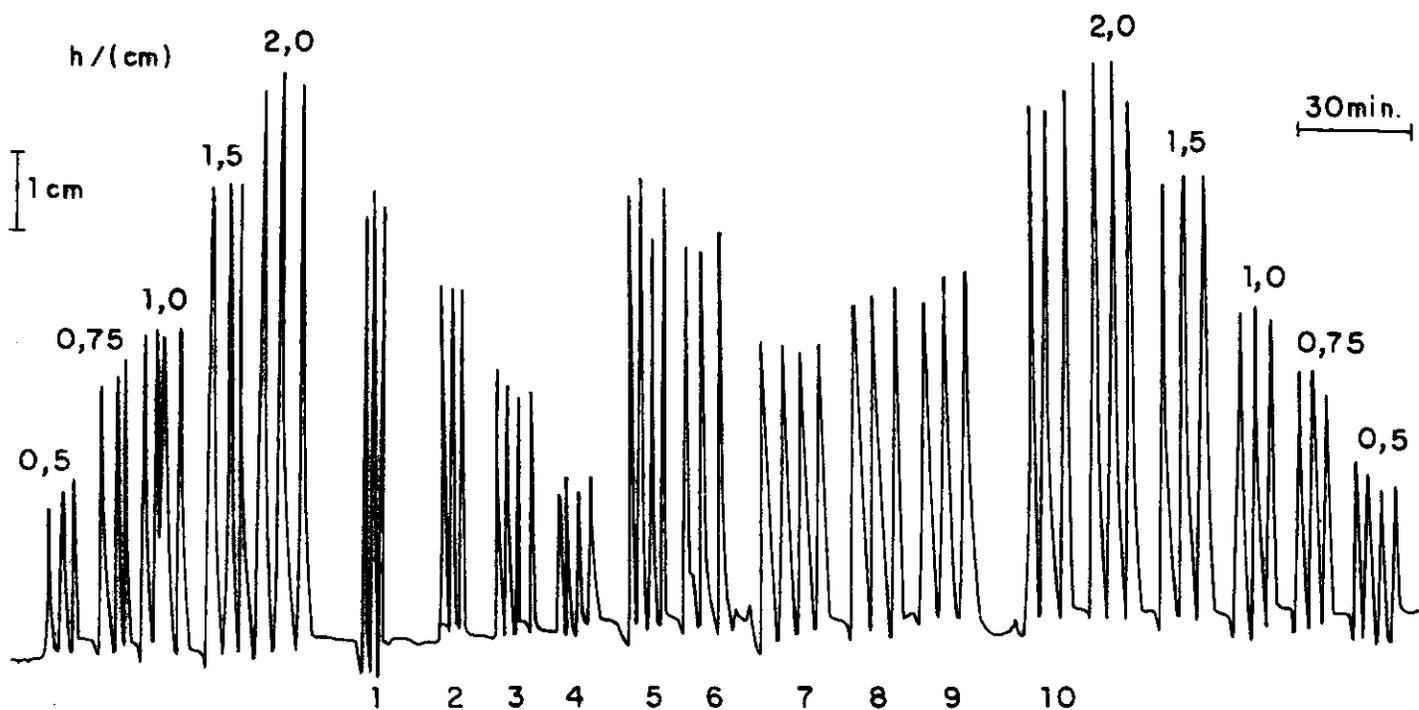


Figura 8.20. Fiagrama das análises de soro. Da esquerda para a direita, sinais em triplicata de padrões de salicilato ($0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) intercalando-se as amostra de soro com salicilato. Vazão $0,6 \text{ mL min}^{-1}$; alça de amostragem $250 \mu\text{L}$; $[\text{NADH}]/[\text{salicilato}]=3:1$; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 7,6; bobina de mistura 45 cm; $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 1,0 \text{ mol L}^{-1}$. ($0,1$ Absorbância = 1 cm). Equação obtida: $h = 0,538 + 3590 \times C$; $R = 0,995$.

Tabela 8.5. Comparação entre os resultados obtidos pelo método de Trinder e pelo método enzimático usando o teste estatístico *t* de Student e o teste F.

O valor de *t* tabulado é de 2,776 para $\nu = 4^*$ e $\alpha = 0,05^{***}$.

O valor de F tabulado é de 19,00 para $\nu = 2^{**}$ e $\alpha = 0,05^{***}$.

Amostras	Enzimático $/(1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})$	Trinder $/(1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})$	Valor calculado de <i>t</i>	Valor calculado de F
1	1,62 ± 0,04	1,63 ± 0,02	0,313	4,00
2	1,15 ± 0,05	1,12 ± 0,02	0,789	6,25
3	0,79 ± 0,05	0,81 ± 0,03	0,500	2,78
4	0,39 ± 0,06	0,40 ± 0,03	0,218	4,00
5	1,49 ± 0,03	1,53 ± 0,04	1,143	1,78
6	1,34 ± 0,06	1,38 ± 0,07	0,514	1,36
7	0,98 ± 0,01	1,00 ± 0,04	0,687	16,00
8	1,13 ± 0,03	1,19 ± 0,02	2,400	2,25
9	1,12 ± 0,04	1,15 ± 0,03	0,857	1,78
10	1,86 ± 0,06	1,96 ± 0,03	2,128	4,00

a- Método de determinação de salicilato através da detecção de gás carbônico. Condições do experimento: vazão 0,6 mL min⁻¹; alça de amostragem 250 µL; [NADH]/[salicilato] = 3:1; temperatura 25 °C; pH 7,6; bobina de mistura 45 cm; [H₂SO₄] = 1,0 mol L⁻¹.

* ν é o grau de liberdade ($n_a + n_b - 2$), onde n_a é igual ao número de determinações do método enzimático (3) e n_b é igual ao número de determinações do método titulométrico (3).

** ν é o grau de liberdade ($n-1$), onde n é igual a 3 determinações.

*** limite de confiança.

Capítulo IX

Avaliação, Conclusões e Proposições Futuras

1. Avaliação e Conclusões

A proposta do trabalho foi desenvolver método para dosagem de salicilato através de reação enzimática e sistema FIA, com vistas ao controle sanguíneo dos níveis de salicilato, que são atingidos após a ingestão de medicamentos a base de ácido acetilsalicílico. Como objetivo adicional, visava-se a aplicação do método na quantificação de ácido acetilsalicílico em medicamentos.

Inicialmente, o primeiro método estudado para a análise de salicilato era condutométrico. A técnica envolvia um sistema FIA e a mesma reação enzimática entre o salicilato e a enzima *salicilato hidroxilase* imobilizada, com a formação de gás carbônico. A solução tamponada contendo este gás era acidificada com uma solução de ácido sulfúrico ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e conduzida a uma membrana de permeação. O gás carbônico permeava através desta membrana, sendo recebido por um fluxo de água desionizada. A medida da condutividade era feita em uma cela de condutância (Tubino, 1994) acoplada a um condutivímetro. Os resultados eram registrados em registrador potenciométrico.

Inúmeros testes foram realizados, entretanto, observava-se a não repetição dos resultados. Inclusive o sinal do branco se apresentou muito alto. Foram feitas várias tentativas para suprimi-lo sem sucesso. Na ocasião usava-se membrana de PTFE, muito permeável, o que deve ter sido a causa do problema. Assim, optou-

se por um método espectrofotométrico para avaliação, em primeira instância, do reator enzimático e determinação de suas variáveis diretas.

Ao desenvolver-se o método espectrofotométrico, optou-se pela membrana de silicón. Mesmo tendo-se observado que esta membrana se comportava bem, não foi possível retornar o estudo do método condutométrico.

A partir dos resultados obtidos, as seguintes conclusões podem ser tiradas:

1.1. Reator Enzimático

Dos processos de imobilização enzimática estudados, o de melhor resultado foi aquele onde a enzima *salicilato hidroxilase* foi imobilizada em pérolas de vidro, desenvolvido o processo de silanização, em meio orgânico. Obteve-se um reator enzimático com 10 unidades de enzima e vida útil de cerca de 60 determinações.

1.2. Determinação Espectrofotométrica de Salicilato Através da Detecção de Catecol

O sistema mostrou-se adequado para determinação na faixa terapêutica de salicilato ($1,1 \times 10^{-3}$ a $2,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Analisando-se amostras de soro numa faixa de $5,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ apresentou limite de detecção de $0,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Houve boa concordância e precisão entre os valores de concentração de salicilato determinados em amostras de soro sanguíneo (tabela 8.2), a partir do método proposto e o de referência (Trinder, 1954). Em testes de recuperação de padrão apresentou recuperação média de 100,1% com estimativa de desvio padrão de 8,2 % (calculado pela equação de 1º grau) e de 99,7 % com estimativa de desvio padrão de 3,4 % (calculado pela equação de 2º grau). O método também foi aplicado na análise de alguns medicamentos, contendo o ácido acetilsalicílico como princípio ativo, e apresentou boa correlação com o método titulométrico

(Farmacopéia Brasileira, 1988) como visto na tabela 8.3. A frequência de amostragem foi de aproximadamente 15 determinações por hora.

1.3. Determinação Espectrofotométrica de Salicilato Através da Detecção de Gás Carbônico

Neste procedimento, também se atingiu a faixa de análise pretendida (faixa terapêutica), com correlação linear na faixa de $5,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e limite de detecção de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Em testes de recuperação de padrão em soro houve uma recuperação média de 101,3 % com estimativa de desvio padrão de 4,9 %. Em comparação com o método anterior houve uma precisão superior embora com menor limite de detecção. Em comparação com o método de referência observou-se concordância entre os valores analisados (tabela 8.5). O método apresentou uma frequência de aproximadamente 15 determinações por hora. De modo geral, pode-se afirmar que os procedimentos desenvolvidos são relativamente simples e de fácil manuseio, ambos apresentando características de viabilidade. Além disto somam-se todas as vantagens inerentes aos processos FIA, que são a rapidez, uso de aparelhagem acessível e uso de pequenas quantidades de amostras e reagentes. Assim, podem ser utilizados para a dosagem de salicilato em soro, principalmente, quando há a necessidade de se quantificar um grande número de amostras num curto período de tempo. Deve-se lembrar, ainda que, o fato dos métodos envolverem enzima os torna altamente seletivos. Entretanto, o método onde a determinação de salicilato deu-se através da detecção de catecol, apresentou-se como o mais prático. Neste sistema não houve a necessidade de um controle rigoroso nos reagentes em relação à absorção de CO_2 do meio ambiente, nem a presença da cela de permeação.

Considerando-se as excelentes propriedades catalíticas das enzimas, o crescente aprimoramento das formas de imobilização e a procura de desenvolvimento de técnicas para a regeneração de cofatores enzimáticos, o uso

de enzimas, tanto na área analítica como na indústria, apresenta-se como um campo bastante promissor.

2. Proposições Futuras

Como perspectivas de trabalhos futuros pode-se sugerir:

- Estudo da imobilização de enzimas desidrogenases juntamente com a enzima *salicilato hidroxilase* no reator enzimático ou a utilização de outro reator contendo este tipo de enzimas visando à regeneração da coenzima NADH.
- Pesquisa de novos suportes para a imobilização da enzima *salicilato hidroxilase*, tais como sílica funcionalizada em óxido de titânio, visando aumento do tempo de vida útil da coluna enzimática.
- Estudo de outras formas de detecção não espectrofotométricas, como a determinação condutométrica do gás carbônico formado na reação enzimática.

Referências

- ALI, S. L. Application of gas-liquid chromatography and high-performance liquid chromatography to the analysis of trace amounts of salicylic acid, acetylsalicylic anhydride and acetylsalicylic acid in aspirin samples and aspirin formulations. *J. Chromatography*, **126**: 651-663, 1976
- ALIVISATOS, S. G. A.; UNGAR, F. & ABRAHAM, G. Non-enzymatic interactions of reduced coenzyme I with inorganic phosphate and certain other anions. *Nature*, **203**: 973- 975, 1964
- AL-KADRA, A. S.; SALEM, D. N.; RAND, W. M.; UDELSON, J. E.; SMITH, J. J. & KONSTAM, M. A. Antiplatelet agents and survival: a cohort analysis from the studies of left ventricular dysfunction (SOLVD) trial. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **31**; 419-425, 1998
- ALVAREZ-ICAZA, M. & BILITEWSKI, U. Mass production of biosensors. *Anal. Chem.*, **65** (11): 525-533, 1993
- ALVAREZ-ROS, M. C.; SÁNCHEZ-CORTÉS, S. & GARGÍA-RAMOS, J. V. Vibrational study of the salicylate interaction with metallic ions and surfaces. *Spectrosc. Acta A*, **56**: 2471- 2477, 2000
- AMICK, E. N. & MASON, W. D. Determination of aspirin, salicylic acid, salicylic acid, and gentisic acid in human plasma and urine by high pressure liquid chromatography. *Anal. Lett.*, **12** (B6): 629-640, 1979

Referências

- ARAÚJO, L. C. L. & MATTOS FILHO, T. R. Estudo comparativo dos efeitos do nimesulide e do ácido acetilsalicílico sobre alguns valores de hemostasia em ratos. *Rev. Ciên. Tecnol.*, **5/2 (10)**: 79-91, 1996
- ASSELIM, W. M. & CAUGHLIN, J. D. A rapid and simple color test for detection of salicylate in whole hemolyzed blood. *J. Anal. Toxicol.*, **14(4)**: 254-255, 1990
- BAADENHUIJSEN, H. & SEUREN-JACOBS, H. E. H. Determination of total CO₂ in plasma by automated flow-injection analysis. *Clin. Chem.*, **25(3)**: 443-445, 1979
- BAIGENT, C.; COLINS, R.; APPLEBY, A.; PARISH, S.; SLEIGHT, P. S. & PETO, R. ISIS-2: 10 year survival among patients with suspected acute myocardial infarction in randomised comparison of intravenous streptokinase, oral aspirin, both or neither. *Brit. Med. J.*, **316**: 1337-1343, 1998
- BAILEY, M. P.; ROCKS, B. F. & RILEY, C. Rapid spectrofluorimetric determination of plasma salicylate with EDTA and terbium. *Anal. Chim. Acta*, **201**: 335-338, 1987
- BANAT, I. M.; MARCHANT, A.; NIGAM, P.; GASTON, S. J. S.; KELLY, B. A. & MARCHANT, R. Production, partial characterization and potential diagnostic use of salicylate hydroxylase from *Pseudomonas putida* UUC-1. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**: 665-670, 1994
- BARROS, F. G. *Determinação condutométrica e colorimétrica de acidez volátil de vinagres e vinhos por injeção em fluxo*. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990

Referências

- BARBEZAT, G. Étude comparée de quelques méthodes de dosage de l'acide salicylique dans le sérum sanguin. *Anal. Chim. Acta* , **13**: 83-88, 1955
- BEKERSKY, I.; BOXENBAUM, H. G.; WHITSON, M. H.; PUGLISI, C. V.; POCELINKO, R. & KAPLAN, S. A. Simultaneous determination of salicylic acid and salicylic acid in plasma and urine by high pressure liquid chromatography. *Anal. Lett.* , **10** (7/8): 539-550, 1977
- BERTOCCHI, P.; D'OTTAVIO, D.; EVANGELISTI, M. E.; MASCINI, M. & PALLESCHI, G. A flow-through system for the determination of salicylate in blood. *Clin. Chim. Acta* , **207**: 205-213, 1992
- BEVITT, R. N.; MATHER, J. R. & SHARMAN, D. C. Minimisation of salicylic acid formation during preparation of aspirin products for analysis by high-performance liquid chromatography. *Analyst*, **109**: 1327-1329, 1984
- BLAIR, D.; RUMACK, B. H. & PETERSON, R. G. Analysis for salicylic acid in serum by high-performance liquid chromatography. *Clin. Chem.*, **24** (9): 1543-1544, 1978
- BING-SHENG, Y.; LI-HUA, N. & SHOU-ZHUO, Y. Ion chromatographic determination of salicylate in human serum with a bulk acoustic wave sensor as detector. *J.High Resol. Chromatogr.*, **20**: 227-230, 1997
- BISHOP, E. *Indicators*. Braunschweig, Vieweg & Sohn Gmbh, 1972, 746 p.
- BORZAK, S.; CANNON, C. P.; KRAFT, P. L.; DOUTHAT, L.; BECKER, R. C.; PALMERI, S. T.; HENRY, T.; HOCHMAN, J. S.; FUCHS, J.; ANTMAN, L. M.; McCALVE, C. & BRAUNVALD, E. Effects of prior aspirin and anti-ischemic

Referências

- therapy on outcome of patients with unstable angina. *Am. J. Cardiol.*, **81**: 678-681, 1998
- BOUVRETTE, P. & LUONG, J. H. T. A coupled enzymic assay for salicylate and acetylsalicylate using salicylate hydroxylase and tyrosinase. *Anal. Chim. Acta*, **335** (1-2): 169-175, 1996
- BUSKIN, J. N.; UPTON, R. A. & WILLIAMS, R. L. Improved liquid-chromatography of aspirin, salicylate and salicylic acid in plasma, with a modification for determining aspirin metabolites in urine. *Clin. Chem.*, **28** (5): 1200-1203, 1982
- CALATAYUD, J. M. *Flow injection analysis of pharmaceuticals – automation in the laboratory*. New York, Taylor & Francis, 1996, 394 p.
- CARVALHO, R. M.; OLIVEIRA NETO & KUBOTA, L.T. Microbiosensor for salicylate based on modified carbon fibre. *Anal. Lett.*, **33**(3): 425-442, 2000
- CASLAVSKA, J.; LIENHARD, S. & THORMANN, W. Comparative use of three electrokinetic capillary methods for determination of drugs in body fluids. *J. Chromatography*, **638**: 335-342, 1993
- CASS, T. & LIGHER, F. S. *Immobilized biomolecules in analysis: A practical approach*. London, Oxford University Press, 1998, 127 p.
- CHAM, B. E.; JOHNS, D.; BOCHNER, F.; IMHOFF, D. M. & ROWLAND, M. Simultaneous liquid-chromatographic quantitation of salicylic acid, salicylic acid, and gentisic acid in plasma. *Clin. Chem.*, **25** (8): 1420-1425, 1979

Referências

- CHAN, W. H.; WONG, M. S. & YIP, C. W. Ion-selective electrode in organic analysis
J. Chem. Educ., **63** (10): 915-916, 1986
- CHANG, Q. & MEYERHOFF, M. E. Membrane-dialyzer injection loop for enhancing
the selectivity of anion-responsive liquid-membrane electrodes in flow
systems. *Anal. Chim. Acta*, **186**: 81-90, 1986
- CHARETTE, J. D.; ZAGER, S. & STORROW, A. B. Trinder's beside test for
qualitative determination of salicylate ingestions. *Amer. J. Emerg. Med.*, **16**
(5): 546-546, 1998
- CHATTARAJ, S. & DAS, A. K. Indirect AAS determination of salicylic acid in
pharmaceuticals. *Indian J. Chem.*, **32 A**: 1009-1011, 1993
- CHOI, K. K. & FUNG, K. W. A salicylate ion-selective membrane electrode based on
aliquat 336S and assay of acetylsalicylic acid. *Anal. Chim. Acta*, **138**: 385-
390, 1982
- CHUBB, S. A. P.; CAMPBELL, R. S.; RAMSAY, J. R.; HAMMOND, P. M.; ATKISON, T.
& PRICE, C. P. An enzyme mediated, colorimetric assay method for the
measurement of salicylate. *Clin. Chim. Acta*, **155**: 209-220, 1986
- CONN, E. E. & STUMPF, P. K. *Introdução à bioquímica*. 4º ed., São Paulo, Edgard
Blücher, 1985, 512 p.
- COUTO, C. M. M. & MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Detectores potenciométricos
para sistemas de análise por injeção em fluxo, evolução e aplicação. *Quím.*
Nova, **23** (6): 774-784, 2000

Referências

- DE LA GUARDIA, M. Biochemical sensors: the state of the art. *Mikrochim. Acta*, **120**: 243-255, 1995
- DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS. 29º ed., Rio de Janeiro, Publicações Científicas Ltda, 2000/2001, 1186 p.
- DUMITRESCU, V.; SURMEIAN, M.; DONEANU, C. & STANESCU, S. Computer program for the determination of salicylic acid content in aspirin by derivative spectrometry. *Anal. Chem. Acta*, **333**: 181-186, 1996
- ECCLES, M.; FREMANTLE, N. & MASON, J. North of England evidence based guideline development project: guideline on the use of aspirin as secondary prophylaxis for vascular disease in primary care. *Brit. Med. J.*, **316**: 1303-1309, 1998
- ECKFEDLT, J. H. & NELSON, K. M. Salicylate determination with a microcentrifugal analyzer and compared with Du Pont aca, Trinder and liquid-chromatography methods. *Clin. Chem.*, **29** (5): 839-841, 1983
- ECKSCHLAGER, K. *Errors, measurement and results in chemical analysis*, London Van Nostrand Reinhold, 1972, 155 p.
- EGOROV, V. V.; BORISENKO, N. D. & RAKHMAN'KO, E. M. Ion-selective electrodes for the determination of salicylic acid: their operational features and application to analysis. *J. Anal. Chem.*, **53** (8): 750-755, 1998
- EHRENDORFER, M.; SONTAG, G. & PITTNER, F. Determination of salicylate in beverages and cosmetics by use of an amperometric biosensor. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **356**: 75-79, 1996

Referências

- EINARSDOTTIR, G. H.; STANKOVICH, M. T. & TU, S. C. Studies of electron transfer properties of salicylate hydroxylase from *Pseudomonas cepacea* and effects of salicylate and benzoate binding. *Biochemistry*, **27**: 3277-3285, 1988
- EVANS, D.; HART, J. P. & REES, G. Voltametric behaviour of salicylic acid at a glass carbon electrode and its determination in serum using liquid chromatography with amperometric detection. *Analyst*, **116**: 803-806, 1991
- FÁGÁIN, C. & O'KENNEDY, R. Functionally-stabilized proteins. A review. *Biotech. Adv.*, **9**: 351-409, 1991
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4º ed., São Paulo, Editora Atheneu , 1988
- FATIBELLO FILHO, O. & CAPELATO, M. Biossensores. *Quím. Nova*, **15** (1): 28-39, 1992
- FERNANDES, J. C.; GARCIA, C. A.; GRANDIN, L. A.; OLIVEIRA NETO, G. & GODINHO, O. E. S. Determination of acetylsalicylic in tablets with salicylate ion selective electrode in a batch injection analysis system. *J. Braz. Chem. Soc.* , **9** (3) :249-251, 1998
- FERREIRA, S. H. Aspirina X Dor. Como funcionam estas drogas. *Ciên. Hoje*, **3** (17): 56-62, 1985
- FERREIRA, V. J. F.; CAVALHEIRO, A. C. V.; FAGNANI, E.; MORAES, M.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. & MELIOS, C. B. An electrode of second kind for aspirin determination in tablet formulations. *Anal. Sciences* , **15**: 249-253, 1999

Referências

- FOGG, A. G.; ALI, M. A. & ABDALLA, M. A. On-line bromimetric determination of phenol, aniline, aspirin and isoniazid using flow injection voltammetry. *Analyst*, **108**: 840-846, 1983
- FONONG, T. & RECHNITZ, G. A. Enzyme electrode for the determination of salicylate. *Anal. Chim. Acta*, **158**: 357-362, 1984
- FREW, J. E.; BAYLIFF, S. W.; GIBBS, P. N. B. & GREEN, M. J. Amperometric biosensor for the rapid determination of salicylate in whole blood. *Anal. Chim. Acta*, **224**: 39-46, 1989
- FRODYMA, M. M.; LIEU, V. T. & FREI, R. W. The application of ultraviolet reflectance spectroscopy to thin-layer chromatography. *J. Chromatography*, **18**: 520-525, 1965
- FUNG, Y. S. & LUK, S. F. Determination of salicylic acid in pharmaceutical formulations and foods by differential-pulse voltammetry using a glass carbon electrode. *Analyst*, **114**: 943-945, 1989
- GARRIGUES, S.; GALLIGNANI, M. & DE LA GUARDIA, M. Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceuticals by flow injection with Fourier transform infrared detection. *Talanta*, **40** (12): 1799-1803, 1993
- GORTON, L.; MARKO-VARGA, G.; DOMÍNGUEZ, E. & EMNÉUS, J. Immobilized enzyme reactors: developmental, practical and theoretical considerations In: *Analytical applications of immobilized enzyme reactors*. 1^o ed. London Blackie Academic and Professional, 1994, 1-19 p.

Referências

- GOTO, Y.; MAKINO, K.; KATAOKA, Y. & SHUTO, H. Determination of salicylic acid in human serum with capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. B*, **706**: 329-335, 1998
- GUIDI, G.; OLZER, D.; SCHIAVON, R. & ZATTI, M. Sensitive salicylate assay in plasma with a "reversed Berthelot's" reaction. *Clin. Chem. Acta*, **131**: 325-332, 1983
- GUI-YUN, Z. & JING-HE, Y. A rapid fluorimetric method for the determination of salicylic acid in serum and urine. *Anal. Lett.*, **17** (B16): 1827-1830, 1984
- HASSAN, S. M. & HAMADA, M. A. Liquid membrane electrode for selective determination of salicylate in pharmaceutical preparations. *Analyst*, **113**: 1709-1713, 1988
- HAYNES, W. M. & WAGENKCHT, J. H. Application of the salicylate ion electrode. *Anal. Chem.*, **4** (8): 491-495, 1971
- HUTCHINS, R. S.; BANSAL, P.; MOLINA, P.; ALAJARIN, M.; VIDAL, A. & BACHAS, L. G. Salicylate-selective electrode based on biometric guanidinium ionophore. *Anal. Chem.*, **69**, 1273-1278, 1997
- INSEL, P. A. Substâncias analgésicas antipiréticas e antiinflamatórias; Drogas empregadas no tratamento da artrite reumatóide e da gota. In: GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. 8º ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991, p. 421-448

Referências

- ISHIBASHI, N.; JYO, A. & MATSUMOTO, K. Some ion-selective electrodes based on ion associate impregnated in plastics matrix. *Chem. Lett.*, **12**: 1297-1298, 1973
- JAMES, H.; CARMACK, G. & FREISER, H. Coated wire ion selective electrodes. *Anal. Chem.*, **44** (4): 856-857, 1972
- JANSSEN, K.; HOLLMAN, P. C.; REICHMAN, E.; VENEMA, D. P.; VAN STAVEREN, W. A. & KATAN, M. Urinary salicylate excretion in subjects eating a variety of diets shows that amounts of bioavailable salicylates in food are low. *Am. J. Clin. Nutr.*, **64** (5): 743-747, 1996
- KANG, E. S.; TODD, T. A.; CAPACI, M. T.; SCHWENZER, K. & JABBOUR, J. T. Measurement of true salicylate concentrations in serum from patients with Reye's Syndrome. *Clin. Chem.*, **29** (6): 1012-1014, 1983
- KARLBERY, B. & PACEY, G. E. *Flow injection analysis. A practical guide*. Amsterdam, Elsevier, 1989, 372 p.
- KARLICEK, R.; GARGOS, M. & SOLICH, P. Flow injection spectrophotometric determination of salicylates using on line solid phase extraction. *J. Flow Injection Anal.*, **13** (1): 45-52, 1996
- KATSU, T. & MORI, Y. Ion-selective electrode for salicylate assay in blood serum. *Talanta*, **43**: 755-759, 1996
- KEES, F.; JEHNICH, D. & GROBECKER, H. Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr B*, **677**:172-177, 1996

Referências

- KELLER, W. J. A rapid method for the determination of salicylate in serum or plasma. *Amer. J. Clin. Pathol.*, **17**: 415-417, 1947
- KHALIL, M. & GONNET, C. Utilisation de la chromatographie en phase liquide en analyse toxicologique. *Analisis*, **11** (9): 463-469, 1983
- KIMBERLY, R. P. & PLOTZ, P.H. Clinical pharmacology in rheumatic diseases. In: *Textbook of rheumatology*. 30° ed., Philadelphia, Philadelphia Saunders Company, 1989, v.1, 1739-1764 p.
- KINCAID, R. L.; McMULLIN, M. M.; SANDERS, D. & RIEDERS, F. Sensitive, selective detection and differentiation of salicylates and metabolites in urine by a simple HPTLC method. *J. Anal. Toxicol.*, **15**: 270-271, 1991
- KING, J. A ; STORROW, B. A. & FINKELSTEIN, J. A. Urine Trinder spot test: a rapid salicylate screen for emergency department. *Annals Emerg. Med.*, **26** (3): 330-333, 1995
- KITAMURA, K. & MAJIMA, R. Determination of salicylic acid in aspirin power by second derivative ultraviolet spectrometry. *Anal. Chem.*, **55**: 54-56, 1983
- KLEINERMAN, M. A rapid fluorimetric method for the determination of salicylate in serum and urine. *Anal. Lett.*, **10** (3): 205-212, 1977
- KONSTANTIANOS, D. G. & IOANNOU, P. C. Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and its major metabolites in human serum by second derivative synchronous fluorescence spectrometry. *Analyst*, **117**: 877-882, 1992

Referências

- KOUPPARIS, M. A. & ANAGNOSTOPOULOU, P. I. Automated flow injection determination of salicylates using Trinder reaction for clinical analyses, assays and dissolution studies of formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **6** (1): 35-46, 1988.
- KRUMHOLZ, H. M.; PHILBIN, D. M.; WANG, Y.; VACCARINO, V.; MURILLO, J. E.; THERRIEN, M. L.; WILLIAMS, J. & RADFORD, M. J. Trends in the quality of care for medicare beneficiaries admitted to the hospital with unstable angina. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **31** (5): 957-963, 1998
- KUBÁN, V. Gas diffusion/permeation flow injection analysis. Part I. Principles and instrumentation. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **23** (5):323-354, 1992
- KUBÁN, V. & DASGUPTA, P. Comparison of photometry and conductometry for the determination of total carbonate by gas permeation flow injection analysis. *Talanta*, **40** (6): 831-840, 1993
- KUBOTA, L. T.; MILAGRES, B. G.; GOUVEA, F. & OLIVEIRA NETO, G. A modified carbon paste electrodes with silica gel coated with Meldola's Blue and salicylate hydroxylase as a biosensor for salicylate. *Anal. Lett.*, **29** (6): 893-910, 1996
- KUBOTA, L. T. ; FERNANDEZ, J. C. B.; ROVER Jr, L. & OLIVEIRA NETO, G. Determination of acetylsalicylic acid by FIA-potentiometric system in drugs after on-line hydrolysis. *Talanta*, **50**: 661-667, 1999
- LANDEK, D. Salicylate procedure for the Cobas-Bio Analyzer. *Clin. Chem.*, **31** (10): 1765, 1985.

Referências

- LÁZARO, F. & LUQUE DE CASTRO, M. D. Gas diffusion/flow injection analysis: applications and trends. *Analisis*, **16** (4): 216-220, 1988
- LEHNINGER, A. L. *Bioquímica*, 2º ed., São Paulo, Edgard Blücher, 1993, v.1, 345 p.
- LEON-GONZALEZ, M. E. & TOWNSHEND, A. Flow-injection determination of paraoxon by inhibition of immobilized acetylcholinesterase. *Anal. Chim. Acta*, **236**: 267-272, 1990
- LI, J.; PANG, X. Y.; DE GAO & YU, R.Q. Salicylate-selective electrode based on lipophilic tin (IV) phthalocyanine. *Talanta*, **42**: 1775-1781, 1995
- LIANG, J. F.; LI, Y. T. & YANG, V. C. Biomedical application of immobilized enzymes. *J. Pharm. Sciences*, **89** (8): 979-989, 2000
- LIMA, A. W. O. & ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. *Quím. Nova*, **22** (2): 229-243, 1999
- LIMA, J. L. F. C.; MONTENEGRO, C. B. M. & ROQUE DA SILVA, A. M. FIA potentiometric determination of salicylate in pharmaceutical preparations with a tubular detector. *J. Flow Injection Anal.*, **7** (1): 19-33, 1990
- LIU, D.; CHEN, W.; SHEN, G. & YU, R. Polymeric membrane salicylate-sensitive electrodes based on organotin (IV) carboxylates. *Analyst*, **121**: 1495-1499, 1996
- LO, L. Y. & BYE, A. Specific and sensitive method for the determination of aspirin and salicylic acid in plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography*, **181**: 473-477, 1980

Referências

- LONGENECKER, R. N.; TRAFTON, J.E. & EDWARDS, R. B. A tableted enzymic reagent for salicylate for use in a discrete multiwavelength analytical system (Paramax). *Clin. Chem.*, **39** (8): 1369-1371, 1984
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. & VALCÁREZ, M. Automatic continuous on-line monitoring of salicylic acid and acetylsalicylic in pharmaceuticals. *J. Autom. Chem.*, **12** (6): 263-266, 1990
- MARCUS, A. J. & BROEKMAN, M. J. Aspirin analogs as antithrombotic agents. *J. Lab. Clin. Med.*, **132**: 446-447, 1998
- MARKO-VARGA, G. & DOMÍNGUEZ, E. Enzyme as analytical tools. *Trends Anal. Chem.*, **10** (9): 290-297, 1991
- MARTIN, C. & DOMÍNGUEZ, E. A new enzyme electrode for quantification of salicylic acid in a FIA system. *J. Pharmac. Biom. Anal.*, **19**: 107-113, 1999
- MASCINI, M.; IANNELLO, M. & PALLESCHI, G. Enzyme electrodes with improved mechanical and analytical characteristics obtained by binding enzymes to nylon nets. *Anal. Chim. Acta*, **146**: 135-148, 1983
- MASON, W. D. & GILLILAN, R. Revised method for determination of aspirin and salicylic acid in human plasma by high pressure liquid chromatography. *Anal. Lett.*, **16** (B 12): 903-912, 1983
- McMAHON, G. P. & KELLY, M. T. Determination of aspirin and salicylic acid in human plasma by column-switching liquid chromatography using on-line solid-phase extraction. *Anal. Chem.*, **70**: 409-414, 1998

Referências

- MICELI, J. N.; ARAVIND, M. K.; COHEN, S. N. & DONE, A. K. Simultaneous measurements of acetaminophen and salicylate in plasma by liquid chromatography. *Clin. Chem.*, **25** (6): 1002-1004, 1979
- MILAGRES, B. G.; OLIVEIRA NETO, G.; KUBOTA, L. T. & YAMANAKA, H. A new amperometric biosensor for salicylate based on salicylate hydroxylase immobilized on polypyrrole film doped with hexacyanoferrate. *Anal. Chim. Acta*, **347**: 35-41, 1997
- MILES, C. I. & SCHENK, G. H. Fluorescence of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using copper (II) acetate as a colour developer. *Analyst*, **110** (42): 656-659, 1970
- MITSANA-PAPAZOGLU, A. M.; DIAMANDIS, E. P. & HADJIOANNOU, T. P. Construction and analytical applications of an improved liquid-membrane electrode for salicylate. *Anal. Chim. Acta*, **159**: 393-396, 1984
- MOORE, T. J.; JOSEPH, M. J.; ALLEN, B. W. & COURY Jr, L. A. Enzymatically amplified voltammetric sensor for microliter sample volumes of salicylate. *Anal. Chem.*, **67** (11): 1896-1902, 1995
- MORAES, R. L. F. *Determinação da salicilemia em crianças portadoras de artrite reumatóide juvenil por colorimetria e espectrofluorimetria*. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986
- MORAES, R. L. F. & SZNELWAR, R. B. Determinação de salicilemia pelo método colorimétrico de Trinder e espectrofluorimétrico de Baselt. *Rev. Farm. Bioquím. Univer. São Paulo*, **23** (2): 159-169, 1987

Referências

- MORRIS, H. C.; OVERTON, P. D.; RAMSAY, J. R.; CAMPBELL, R.S.; HAMMOND, P. M. ATKINSON, T. & PRICE, C. P. Development and validation of an automated, enzyme-mediated colorimetric assay of salicylate in serum. *Clin. Chem.*, **36** (1): 131-135, 1990
- MURACHI, T. & TABATA, M. Use of immobilized enzyme column reactors in clinical analysis. *Methods. Enzym.*, **137**: 260-271, 1988
- MUTCHIE, K. L.; SAUNDERS, G. H.; HANISSIAN, A. R. & POE, T. E. Interlaboratory salicylate variability. *J. Rheumatology*, **7**:737-740, 1980
- NEUMAYR, M.; FRIEDRICH, O. & SONTAG, G. Low-injection analysis with electrochemical detection for determination of salicylate acid in pharmaceutical preparations. *Anal. Chim. Acta*, **273**: 469-475, 1993
- NEUMAYR, M.; SONTAG, G. & PITTNER, F. Enzymatic sensor coupled to a flow-injection analysis system for the determination of salicylate. *Anal. Chim. Acta*, **305**: 26-31, 1995
- NIETSCH, P. *Therapeutic applications of aspirin®*, Germany, wbn-verlag Bingen/Rhein, Bayer A.G., 1989, 69 p.
- NIMURA, N.; ITOH, H. & KINOSHITA, T. Diol-bonded silica gel as a restricted access packing forming a binary-layered phase for direct injection of serum for the determination of drugs. *J. Chromatography*, **689**: 203-210, 1995
- OLIVEIRA NETO, G. & YAMANAKA, H. Enzimas e materiais biológicos imobilizados: biossensores. *Quím. Nova*, **11** (4): 432-435, 1988

Referências

- OLIVEIRA NETO, G.; ROVER Jr, L. & KUBOTA, L. T. Electrochemical biosensors for salicylate and its derivatives. *Electroanalysis*, **11** (8): 527-533, 1999
- OROZCO, F. V. & GUERRA, F. Simplified method for the quantitative determination of salicylates in blood serum. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.*, **16**(2): 10pp.,1946.
Apud: *Chem. Abstr.*, **40**: 7261, 1946
- OU, C. & FRAWLEY, D. Theophylline, dyphylline, caffeine, acetaminophen, salicylate, acetylsalicylate, procainamide and n-acetylprocainamide determined in serum with a single liquid chromatographic assay. *Clin. Chem.*, **28** (10): 2157-2160, 1982
- PANDEY, P. & CHAUHAN, R. S. Membranes for gas separation. *Prog. Polym. Sci.* **26**: 853-893, 2001
- PAYAN, D. C. Antiinflamatórios não-esteróides. In: *Farmacologia básica e clínica*. 5º ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994, p. 368-372
- PELTONEN, V. & SHAMMAS, S. Adaptation of modified Trinder salicylate acid assay to the Kone Progress Selective. *Clin. Chem.*, **32** (6): 1059, 1986
- PEREIRA, R. C.; ALEIXO, L. M.; GODINHO, O. E. S. & OLIVEIRA NETO, G. Construção, avaliação e aplicação analítica de um eletrodo seletivo sensível a salicilato. *Quím. Nova* , **13** (3): 202-204, 1990
- PIROLA, R.; BAREGGI, S. R. & DE BENEDITTIS, G. Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in skin and plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography B* , **705**: 309-315, 1998

Referências

- PRICE, C. P.; CAMPBELL, R.S. & HAMMOND, P. M. Novel enzymes as reagent. *Clin. Chim. Acta*, **237**: 3-16, 1995
- PROUDFOOT, A. T. Toxicity of salicylate. *Am. J. Medic.*, **14**: 99-103, 1983
- PULGARÍN, J. A. M. & MOLINA, A. A. Determination of salicylic and gentisic acids in the presence of each other matrix isopotential synchronous fluorescence spectrometry. *Analyst*, **119**: 1915-1919, 1994
- RABA, J. & MOTTOLA, H. Glucose oxidase as an analytical reagent. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **25** (1):1-42, 1995
- RAHNI, M. A. N.; GUIBALT, G. G. & OLIVEIRA NETO, G. Immobilized enzyme electrode for determination of salicylate in blood serum. *Anal. Chim. Acta*, **181** (31): 219-225, 1986
- RAO, G. R.; KANJILAL, G. & MOHAN, K. R. Extended application of Folin-Ciocalteu reagent in the determination of drugs. *Analyst*, **103**: 993-994, 1978
- REIS, B. F.; GINÉ, M. F. & KRONKA, E. A. M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. *Quím. Nova*, **12** (1): 82-91, 1989
- REIS, B. F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. *Quím. Nova*, **19** (1):51-58, 1996
- RESHETILOV, A. N. Models of biosensors based on principles of potentiometric and amperometric transducers: use in medicine, biotechnology, and environmental monitoring (review). *Applied Biochem. Microbiol.*, **32** (1): 72-93, 1996

Referências

- RIVAS, G. A. & CALATAYUD, J. M. FIA-AAS determination of salicylic by a solid-phase reactor of copper carbonate incorporated in polyester resin beads. *Talanta*, **42**: 1285-1289, 1995
- ROCHA, F. R. P. & NÓBREGA, J. A. Efeito Schlieren em sistemas de análise por injeção em fluxo. *Quím. Nova*, **19** (6): 636-640, 1996
- RODNAN, G. P. & BENEDEK, T. G. The early history of antirheumatic drugs. *Arthritis Rheum.*, **13** (2): 145-165, 1970
- ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N. & KUBOTA, L.T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Quím. Nova*, **24** (1):77-86, 2001
- ROVER Jr, L.; GARCIA, C. A.; OLIVEIRA NETO, G.; KUBOTA, L. T. & GALEMBEK, F. Acetylsalicylic acid determination using a salicylate-sensitive tubular electrode with an ethylene-vinyl acetate membrane. *Anal. Chim. Acta*, **366**: 103-109, 1998
- ROVER Jr, L.; FERNANDEZ, J. C. B.; OLIVEIRA NETO, G.; KUBOTA, L. T.; KATEKAWA, E. & SERRANO, S. H. P. Study of NADH stability using ultraviolet-visible spectrophotometric analysis and factorial design. *Anal. Biochem.*, **260**: 50-55, 1988-b
- ROVER Jr, L.; OLIVEIRA NETO, G.; FERNANDEZ, J. R. & KUBOTA, L. T. Determination of salicylate in blood serum using an amperometric biosensor based on salicylate hydroxylase immobilized in a polypyrrole-glutaraldehyde matrix. *Talanta*, **51**: 547-557, 2000

Referências

- RUZICKA, J. & HANSEN, E. H. Flow injection analyses. Part I. A new concept of fast continuous analysis. *Anal. Chim. Acta*, **78**: 145-157, 1975
- SAHA, U. & BAKSI, K. Spectrophotometric determination of salicylic acid in pharmaceutical formulations using copper (II) acetate as a colour developer. *Analyst*, **110**: 739-741, 1985
- SALINAS, F.; DE LA PEÑA, A. M.; DURÁN-MERÁS, I. & DURÁN, M. S. Determination of salicylic acid and its metabolites in urine by derivative synchronous spectrofluorimetry. *Analyst*, **115**: 1007-1011, 1990
- SANTOS, S. R. C. J.; DÉCOURT, L. V.; ROSALES, T.; SANTOS, M. L. A. & TAVARES, J. G. N. Determinação de salicilato em plasma: comparação de métodos. *An. Farm. Quím. S. Paulo*, **20** (1/2): 286-301, 1980
- SARMA, L.; WONG, S. H. & DELAFERA, S. Difusional significantly interferences with salicylate measurements by FPIA-TDx and UV-VIS Aca methods. *Clin. Chem.*, **31** (11): 1922-1923, 1985
- SCHELLER, F.; SHUBERT, F.; PFEIFFER, D.; HINTSCHE, R.; DRANSFELD, I.; RENNEBERG, R.; WOLLENBERGER, U.; RIEDEL, K.; PAVLOVA, M.; KÜHN, M.; MÜLLER, H.; TAN, P. T.; HOFFMANN, W. & MORITZ, W. Research and development of biosensors. A review. *Analyst*, **114**: 653-662, 1989
- SCHMIDT, H. L.; BECKER, T.; OGBOMO, I. & SCHULMANN, W. Flow-injection analysis systems with immobilized enzymes. Improvement of applicability by integration of coupled reactions, separation steps and background correction. *Talanta*, **43**: 28-39, 1992

Referências

- SCRIBAN, R. *Biotecnologia*, São Paulo, Manole, 1985, 489 p.
- SHAHROKHIAN, S.; AMINI, M. K.; KIA, R. & TANGESTANINEJAD, S. Salicylate-selective electrodes based on Al (III) and Sn (IV) salophens. *Anal. Chem.*, **72**: 956-962, 2000
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M. & HOLLER, F. J. *Fundamentals of analytical chemistry*, 7^o ed., Philadelphia, Saunders College Publishing, 1996, p 57.
- SMITH, M. J. H. & TALBOT, J. M. The estimation of plasma salicylate levels. *Br. J. Exp. Pathol.*, **31**: 65-69, 1950
- SOARES, T. A. & LINS, R. D. Ribozimas: nem toda enzima é proteína. *Quím. Nova*, **18**: 375-378, 1995
- SOROCHINSKII, V. V. & KURGANOV, B. I. Biosensors for detecting organic compounds: I. Sensors for amino acids, urea, alcohols, and organic acids (review). *Applied Biochem. Microb.*, **33** (6): 515-529, 1997
- SOROCHINSKII, V. V. & KURGANOV, B. I. Biosensors for detecting organic compounds: II. Sensors for carbohydrates and aromatic, heterocyclic, and other organic compounds (review). *Applied Biochem. Microb.*, **34** (1): 19-38, 1998
- SOTOMAYOR, M. P. T. *Construção e aplicação de optodos em sistemas analíticos baseados em variações de pH*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000

Referências

- STEFAN, R.; BAIULESCU, G. & ABOUL-ENEIN, H. Y. Ion-selective membrane electrodes in pharmaceuticals analysis. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **27** (40): 307-321, 1997
- STEVENSON, G. W. Rapid ultraviolet spectrometric determination of salicylate in blood. *Anal. Chem.*, **32** (11): 1522-1525, 1960
- STRYER, R. L. *Biochemistry*, New York, Freeman and Company, 1994, 1098 p.
- SUNDARAN, P. V. Routine analysis with immobilized enzyme nylon tube reactors. *Method. Enzymol.*, **137**: 288-297, 1988
- TARNAKOY, A. L. & BREWS, V. A. L. A simple estimation of salicylate in serum. *J. Clin. Pathol.*, **3**: 289-291, 1950. Apud: *Chem. Abst.*, **45**: 5227, 1951
- TERWEIJ-GROEN, C. P.; VAHLKAMP, T. & KRAAK, J. C. Rapid, direct determination of trace amounts of salicylic acid in deproteinized serum by means of high-pressure liquid-liquid chromatography. *J. Chromatography*, **145**: 115-122, 1978
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. The national formulary, 21^o ed., United States Pharmacopeial Convention , 1985, p.76
- TORRES, K. Y.; GARCIA, C. A. B.; FERNANDES, J. C. B.; OLIVEIRA NETO, G. & KUBOTA, L. T. Use of self-plasticizing EVA membrane for potentiometric anion detection. *Talanta*, **53**: 807-814, 2001
- TRINDER, P. Rapid determination of salicylate in biological fluids. *Biochem. J.*, **57**: 301-303, 1954

Referências

- TRYZELL, R. & KARLBERG, B. Efficiency and response studies on gas diffusion manifolds in flow-injection systems. *Anal. Chim. Acta* , **308**: 206- 213, 1995
- TUBINO, M. A conductometric detector for flow injection analysis. *J. Flow Injection Anal.*, **11** (1): 94-96, 1994
- TUBINO, M. & BARROS, F. G. Uma válvula introdutora de amostra para análise por injeção em fluxo. *Quím. Nova* , **14** (1):49-51, 1991
- VADGAMA, P. & CRUMP, P. W. Biosensors: recent trends. A review. *Analyst*, **117** (11): 1657-1670, 1992
- VAN DER LINDEN, W. E. Membrane separation in flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, **151** (3): 349-351, 1983
- VILLARI, A ; MICALI, N.; FRESTA, M. & PUGLISI, G. Spectrofluorimetry at zero angle: determination of salicylic acid in an acetylsalicylic pharmaceutical formulation. *Analyst*, **119**: 1561-1565, 1994
- WANG, J. Organic-phase biosensors. New tools for flow analysis: a short review. *Talanta* , **40** (12); 1905-1909, 1993
- WANG, L. & TU, S. The kinetic mechanism of salicylate hydroxylase as studied by initial rate measurement, rapid reaction kinetics, and isotope effects. *J. Biol. Chem.*, **259** (17): 10682-10688, 1984
- WEETALL, H. Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports. *Applied Biochem. Biotech.*, **41**: 157-188, 1993

Referências

- WEICHELBAUM, T. E. & SHAPIRO, I. A rapid and simple method for determination of salicylic acid in small amounts of blood plasma. *Amer. J. Clin. Pathol.*, **9**(30): 42-44, 1945
- WHITE-STEVENSON, R. H.; KAMIN, H. & GIBSON, Q. H. Studies of a flavoprotein, salicylate hydroxylase. *J. Biolog. Chem.*, **247** (8): 2371-2381, 1972
- WILBERT, S. M.; ERICSSON, L. H. & GORDON, M. P. Quantification of jasmonic acid, methyl jasmonate, and salicylic acid in plants by capillary liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **257**: 184-194, 1998
- WILDING, P.; PFAHLER, J.; BAU, H. H.; ZEMEL, J. N. & KRICKA, L. J. Manipulation an flow of biological fluids in straight channels micromachined in silicon. *Clin. Chem.*, **40** (1): 43-47, 1994
- WINDMÖLLER, D. *Pervaporação pressurizada*. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991
- WINGARD, L. B.; KASTCHALSKI-KATZIR, E. & GOLDSTEIN, L. Applied biochemistry and bioengineering. *Enzyme Technology*, v.2, 1980, p.64
- WORSFOLD, P. J. Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes. *Pure & Appl. Chem.*, **67** (4): 597-600, 1995
- YIP, L.; JASTREMSKI, M. & DART, R. Salicylate intoxication. *J. Intensive Care Med.*, **12**: 66-78, 1997
- YOU, K. Polarographic quantification of salicylate in serum by salicylate hydroxylase. *Clin. Chim. Acta*, **149**: 281-284, 1985

Referências

- YOU, K. & BITTIKOFER, J. A. Quantification of salicylate in serum by use of salicylate hydroxylase. *Clin. Chem.*, **30** (9): 1549-1551, 1984
- ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C. & COLLINS, C. Classificação e definição dos métodos de análise de fluxo (Recomendações – IUPAC 1994). *Quím. Nova*, **22** (1):143-146, 1999
- ZAITSEV, V. N.; COLOMIETS, L. I.; ELSKKAYA, A. V.; SKOPENKO, V. V. & EVANS, J. Covalent immobilization of immoglobulin on a wafer surface for immunosensor bioselective matrix construction. *Anal. Chim. Acta*, **252**: 1-6, 1991
- ZAUGG, S.; ZHANG, X.; SWEDLER, J. & THORMANN, W. Determination of salicylate, gentisic acid and salicylic acid in human urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatog. B*, **752**: 17-31, 2001
- ZHOU, D.; NIGAM, P.; JONES, J. & MARCHANT, R. Production of salicylate hydroxylase from *Pseudomonas putida* UUC-1 and its application in the construction of a biosensor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **64**: 331-338, 1995