UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Tereza Cristina Rodrigues e aprovada pela comissão julgadora.

Desenvolvimento de Métodos Enzimáticos em Fluxo para a Determinação Quantitativa de Acetilcolina e de Paraoxon.

TESE DE DOUTORADO

02 85680

R618D

Tereza Cristina Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Matthieu Tubino.

Janeiro - 1998

ÍNDICE

Lista de Figuras.....i

Lista de Tabelas.....v

Resumo.....vii

Abstract.....viii

Objetivo.....ix

Capítulo I

I - Introdução.....01

I.1 - Transmissão de Impulsos dos Nervos às Fibras Musculares Esqueléticas....01

I.2 - Mecanismo Catalítico da Colinesterase.....04

I.3 - Fármacos que Inativam a Colinesterase.....05

I.4 - Organofosforados como Inibidores da Colinesterase.....12

I.5 - Substância que Recuperam a Atividade da Colinesterase.....14

Capítulo II

II - Biossensores

II.1 - Definição.....18

II.2 - Aplicação.....19

II.3 - Métodos de Imobilização.....23

II.4 - Transdutores.....27

II.4.1 - Sensores Potenciométricos.....27

II.4.2 - Sensores Amperométricos.....28

II.4.3 - Sensores Ópticos.....30

II.4.3 - Sensores Condutimétricos.....31

Capítulo III

III – Métodos Analíticos para Determinação de Pesticidas Organofosforados

III.1 - Pesticidas - Conceito e Aplicação.....32

III.2 - Danos Causados ao Homem.....34

III.3 - Monitoramento de Pesticidas.....35

III.4 - Métodos para a Determinação de Pesticidas Organofosforafos.....36

III.5 - Métodos para a Determinação de Pesticidas Organofosforafos.....37

a) Eletrodos Potenciométricos Utilizados na Determinação de Pesticidas Organofosforados.....38

b) Biossensores Amperométricos.....39

c) Biossensores Condutimétricos.....41

d) Biossensores Ópticos.....41

Capítulo IV

IV - Procedimento Experimental

IV.1 - Equipamentos..... 43

IV.2 - Reagentes..... 43

IV.2.1 - Preparação das Solução Tampão Fosfato..... 44

IV.2.1 - Preparação das Soluções de Acetilcolina..... 45

IV.2.2 - Preparação das Soluções de Paraoxon.....45

IV.2.3 - Preparação das Soluções de TMB-4.....45

IV.2.4 - Preparação das Soluções de PBC.....46

IV.3 - Imobilização da Enzima..... 47

IV.2.2 - Imobilização da Enzima em "CPG".....45

a) Limpeza do "CPG".....47

b) Alquilação do "CPG" Via Silanização.....47

c) Acoplamento com Glutaraldeído.....48

a) Imobilização da enzima nos "CPG".....49

IV.2.3 - Imobilização da Enzima em Sílica gel Modificada.....49

IV.4 - Construção da Coluna Enzimática..... 50

IV.5 - Sistema FIA Utilizado..... 50

IV.5.1 - Determinação de Acetilcolina pelo Método Condutimétrico.....50

IV.5.2 - Determinação de Paraoxon pelo Método Condutimétrico.....52

IV.5.3 - Determinação de Acetilcolina pelo Método Espectrofotométrico.....53

IV.5.4 - Determinação de Paraoxon pelo Método Espectrofotométrico.....55

Capítulo V

V - Determinação de Acetilcolina por Condutometria

Resultados e Discussão.....56

V.1 - Precisão do Método.....58

V.2 - Exatidão do Método.....59

V.3 - Durabilidade da Coluna.....60

V.4 - Efeito da Variação de Condições do Sistema FIA.....61

V.4.1 - Variação da Concentração de Ácido Sulfúrico.....61

V.4.2 - Variação da Vazão.....61

V.5 – Taxa de Amostragem do Método.....63

V.6 - Comparação Entre Dois Métodos de Imobilização.....63

V.6.1 - Tempo de Vida do Reator Enzimático.....63

V.6.1 - Sensibilidade e Reprodutibilidade.....64

V.6.3 – Taxa de Amostragem do Método.....66

Capítulo VI

VI - Determinação de Acetilcolina por Espectrofotometria

Resultados e Discussão.....67

VI.1 - Precisão do Método.....67

VI.2 - Exatidão do Método.....69

VI.3 - Efeito da Variação de Condições do Sistema FIA.....70

VI.3.1 - Variação da Concentração de Ácido Sulfúrico.....70

VI.3.2 - Variação da Vazão Fluxo..... 72

VI.4 - Tempo de Análise do Método.....74

Capítulo VII

VII- Determinação de Pesticidas Pelo Método Condutimétrico

Resultados e Discussão..... 75

VII.1 - Precisão e Sensibilidade do Método..... 77
VII.2 - Durabilidade da Coluna..... 79
VII.3 - Efeito da Variação de Condições do Sistema FIA..... 79
VII.3.1 - Variação da Vazão..... 79
VII.3.2 - Variação da Temperatura..... 83
VII.3.3 - Variação da Concentração do Substrato..... 85
VII.3.4 - Variação da Alça de Amostragem..... 88
VII.3.2 - Variação da Concentração de TMB-4..... 90
VII.4 - Número de Determinações de Paraoxon..... 90
VII.5 – Determinação de Paraoxon por FIA-Sopped Flow..... 91

Capítulo VIII

VIII - Determinação do Paraoxon por Espectrofotometria

Resultados e Discussão..... 93

VIII.1 - Precisão e Sensibilidade..... 94
VIII.2 - Efeito da Variação de Condições do Sistema FIA..... 95
VIII.2.1 - Variação da Vazão..... 96
VIII.2.2 - Variação da Temperatura..... 99
VIII.2.3 - Variação da Concentração do Substrato..... 101
VIII.2.4 - Variação da Alça de Amostragem..... 104

Capítulo IX

IX - Conclusões 107

IX.1 - Sistema FIA Condutimétrico 107

Sensibilidade e Reprodutibilidade do Método 108

IX.2 - Sistema FIA Conductimétrico Stopped Flow 109

Sensibilidade e Reprodutibilidade do Método 109

IX.3 - Sistema FIA Espectrofotométrico 110

Sensibilidade e Reprodutibilidade do Método 110

IX.4 - Comparação entre os dois Métodos de Detecção 111

IX.5 - Comparação entre os dois Métodos de Imobilização 111

Capítulo X

IX - Referências Bibliográficas 113

Lista de Figuras

Figura I.1 - Mecanismo da Reação Enzimática entre Acetilcolina e a Colinesterase..... 02

Figura I.2 - Ciclo das Transformações da acetilcolina na placa terminal..... 03

Figura I.3 - Mecanismo de Catálise da Acetilcolina pela Colinesterase..... 04

Figura I.4 - Complexo Carbamil-Enzima 06

Figura I.5 - Inativação da Colinesterase por di-isopropil-fosfato..... 08

Figura I.6 – Esquema da Inativação da Colinesterase por di-isopropil-fosfato..... 08

Figura I.7 - Alguns Inibidores Reversíveis da Colinesterase..... 09

Figura I.8 - Alguns Inibidores Irreversíveis da Colinesterase..... 10

Figura I.9- Mecanismo de Hidrólise da Sarina..... 11

Figura I.10 - Exemplos de Compostos Organofosforados Empregados como Inseticidas..... 13

Figura I.11 - Reativação da Acetilcolinesterase pela Hidroxilamina Inibida por DIPF..... 14

Figura I.11 - Metiliodeto de piridinaldoxima (PAM)..... 14

Figura I.12 - Reativação da Acetilcolinesterase por PAM..... 15

Figura I.13 – Reativação da acetilcolinesterase por PAM 16

Figura I.14 – Esquema Geral da Reativação da Enzima.....17

Figura II.1 - Métodos de Imobilização de Enzima pelo Método de Ligação Covalente 26

Figura IV.1 - Sistema Reservatório de Púrpura de Bromocresol.....46

Figura IV.2 - Sistema FIA Utilizado no Método Condutimétrico..... 51

Figura IV.3 - Sistema FIA Utilizado no Método Espectrofotométrico.....54

Figura V.1 - Fiagrama de Determinação de Acetilcolina pelo Método Condutimétrico..... 57

Figura V.2 - Curva de Calibração para Determinação de Acetilcolina..... 58

Figura V.3 - Fiagrama de Determinação de Acetilcolina pelo Método Condutimétrico Utilizando Sílica gel..... 64

Figura V.4 - Curva de Calibração para a Determinação de Acetilcolina Utilizando Sílica gel..... 65

Figura VI.1 - Fiagrama de Determinação de Acetilcolina pelo Método Espectrofotométrico.....68

Figura VI.1 - Curva de Calibração de Acetilcolina por Espectrofotometria.....69

Figura VI.3.2 - Determinação da Concentração de Acetilcolina em Função da Concentração de Ácido Sulfúrico..... 72

Figura VI.3.3 - Determinação da Concentração de Acetilcolina em Função do Fluxo..... 74

Figura VII.1 - Efeito da Inibição da Acetilcolinesterase pelo Paraoxon e Posterior Reativação da Enzima com TMB-4..... 76

Figura VII.2 - Curva de Calibração do Paraoxon pelo Método Condutimétrico..... 78

Figura VII.3 - Efeito da Variação do Fluxo na Determinação de Paraoxon pelo Método Condutimétrico..... 80

Figura VII.4 - Efeito da Temperatura na Determinação de Paraoxon pelo Método Condutimétrico..... 83

Figura VII.5 - Efeito da Concentração de Acetilcolina na Determinação de Paraoxon pelo Método Condutimétrico..... 84

Figura VII.6 - Efeito do Tamanho da Alça de Amostragem na Determinação de Paraoxon pelo Método Condutimétrico..... 89

Figura VII.7 - Curva de Calibração do Paraoxon pelo Método Stopped – Flow..... 92

Figura VIII.1 - Fiagrama de Determinação de Paraoxon pelo Método Espectrofotométrico..... 93

Figura VIII.2 - Curva de Relação Linear entre Absorbância e Concentração de Paraoxon..... 94

Figura VIII.3 - Efeito da Variação do Fluxo na Determinação de Paraoxon pelo Método Espectrofotométrico..... 96

Figura VII.4 - Efeito da Temperatura na Determinação de Paraoxon pelo Método Espectrofotométrico..... 100

Figura VII.5 - Efeito da Concentração do Substrato na Determinação de Paraoxon pelo Método Espectrofotométrico..... 102

Figura VIII.6 - Efeito do Tamanho da Alça de Amostragem na Determinação de Paraoxon pelo Método Espectrofotométrico..... 104

Lista de Tabelas

Tabela II.1 – Principais Eletrodos Disponíveis Comercialmente..... 21

Tabela II.2 – Alguns Processos de Imobilização para Enzimas..... 23

Tabela V.I – Teste de Recuperação, pelo Método de Adição Padrão na Determinação de Acetilcolina em Formulação Oftálmica..... 60

Tabela V.2 – Determinação da concentração de acetilcolina em função da variação da concentração do ácido sulfúrico..... 61

Tabela V.3 – Determinação de Concentração de Acetilcolina em Função do Fluxo por Condutimetria..... 62

Tabela VI.1 – Teste de Recuperação, pelo Método de Adição Padrão na Determinação de Acetilcolina por Condutimetria..... 70

Tabela VI.2 – Concentração de Acetilcolina em Função da Variação Concentração do Ácido Sulfúrico..... 73

Tabela VI.3 – Determinação da Concentração de Acetilcolina em Função do Fluxo por Espectrofotometria..... 71

Tabela VII.1 – Efeito do Fluxo na Determinação de Paraoxon pelo Método Condutimétrico..... 78

Tabela VII.2 – Efeito da Temperatura na Determinação de Paraoxon pelo Método Condutimétrico..... 84

Tabela VII.3 – Efeito do Fluxo na Determinação de Paraoxon pelo Método Condutimétrico..... 87

Tabela VII.4 – Efeito do Tamanho da Alça de Amostragem na Determinação de Paraoxon pelo Método Condutimétrico.....88

Tabela VIII.1 – Efeito do Fluxo na Determinação de Paraoxon pelo Método Espectrofotométrico..... 97

Tabela VIII.2 – Efeito da Temperatura na Determinação de Paraoxon pelo Método Espectrofotométrico.....101

Tabela VII.3 – Efeito da Concentração do Substrato na Determinação de Paraoxon pelo Método Espectrofotométrico.....103

Tabela VIII.4 – Efeito do Tamanho da Alça de Amostragem na Determinação de Paraoxon pelo Método Espectrofotométrico..... 105

RESUMO

Neste trabalho, foi desenvolvido um sistema de injeção em fluxo para determinação quantitativa de acetilcolina. O método é baseado na geração de ácido acético pela reação da enzima (acetilcolinesterase) com o substrato (acetilcolina). Esta enzima foi quimicamente imobilizada em "glass beads". O ácido acético formado pela reação da colinesterase com acetilcolina permeia através de uma membrana de poli-tetrafluoretileno (PTFE) para um fluxo de água deionizada, e é detectado em uma célula condutimétrica. A relação entre a altura de pico e concentração de ácido acético formado é proporcional à concentração de acetilcolina presente na amostra, na faixa de concentração proposta. Foi encontrada uma faixa linear de $1,0\times10^{-5}$ mol.L^{-1} a $1,0\times10^{-3}$ mol.L^{-1} de acetilcolina versus altura de pico.

Neste trabalho também foi desenvolvido um sistema FIA condutimétrico para detecção quantitativa do dietil p-nitrofenil fosfato (paraoxon), pesticida amplamente utilizado na agricultura. Com a introdução de uma concentração conhecida de paraoxon no sistema FIA, foi observado um decréscimo da altura do pico, como função direta de um decréscimo da quantidade de ácido acético formado, devido à inibição da colinesterase. A correlação entre a diferença de pico versus concentração de paraoxon, é linear na faixa de $1,0\times10^{-7}$ mol.L^{-1} a $5,0\times10^{-5}$ mol.L^{-1}, portanto, o limite quantitativo de detecção foi cerca de $1,0\times10^{-7}$ mol.L^{-1} de paraoxon. Para propostas semi-quantitativas, o limite de detecção pode ser considerado cerca de $5,0\times10^{-8}$ mol.L^{-1} para o paraoxon. O desvio padrão relativo obtido foi de 2,2%(n=8), para uma solução de acetilcolina $1,0\times10^{-3}$ mol.L^{-1} e uma solução de $5,0\times10^{-6}$ mol.L^{-1} de paraoxon. Para a reativação da enzima imobilizada, foram utilizadas soluções de 1,1'-trimetileno-bis(brometo de 4-formilpiridina) dioxima (TMB-4).

O sistema "stopped-flow" foi estudado de forma a obter uma maior capacidade de inibição da colinesterase. A correlação entre a diferença de altura de pico versus concentração de paraoxon é linear na faixa de $1,0\times10^{-7}$ mol.L^{-1} a $5,0\times10^{-9}$ mol.L^{-1}. O sistema apresentou um limite de detecção de $5,0\times10^{-9}$ mol.L^{-1} para o pesticida. O desvio padrão relativo foi de 1,2% (n=6), para uma solução de acetilcolina $1,0\times10^{-3}$ mol.L^{-1} e uma solução de $4,0\times10^{-8}$ mol.L^{-1} de paraoxon.

Também foi desenvolvido um método de determinação quantitativa para acetilcolina e para o paraoxon com detecção espectrofotométrica. Nesta caso, o ácido acético formado permeia através da membrana PTFE e é recebido por um fluxo de uma solução de púrpura de bromocresol (PBC) e é detectado espectrofotometricamente. Foi encontrado uma linearidade entre concentração de acetilcolina e altura de pico na faixa de $1,0\times10^{-4}$ a $5,0\times10^{-3}$ mol.L^{-1}. O procedimento proposto apresentou um limite de detecção de $1,0\times10^{-7}$ mol.L^{-1} para o paraoxon, a correlação entre altura de pico e concentração de paraoxon foi de $5,0\times10^{-7}$ mol.L^{-1} a $5,0\times10^{-5}$ mol.L^{-1}, com um desvio padrão relativo de 1,7% (n=10) para uma solução de acetilcolina $5,0\times10^{-3}$ mol.L^{-1} e uma solução de $5,0\times10^{-6}$ mol.L^{-1} de paraoxon.

ABSTRACT

In this work, a flow injection system for quantitative determination of acetylcholine was developed. The method is based on the generation of acetic acid by the reaction of acetylcholine with the enzyme cholinesterase. This enzyme was chemically immobilized on "CPG". The acetic acid formed by the enzyme (actylcholinesterase) reaction with the substrate (acetylcholine) permeates through a poly-(tetrafuoroethylene) (PTFE) membrane into a de-ionized water stream, and is detected conductimetrically in a flow-through cell. The relationship between the signal height and acetic acid concentration formed is proportional to the acetylcholine concentration present in the sample, in the purposed concentration range.

A system conductimetric was developed for quantitative diethyl p-nitrophenyl phosphate (paraoxon) determinations, a pesticide of widespread used in agriculture. Introducing into the system a given concentration of paraoxon solution and observing the decrease of the reaction product as a decrease in the signal height, as a result of the decrease in the quantity of acetic acid formed, by inhibition of immobilized cholinesterase. The correlation between the peak height, for a given acetylcholine concentration, is linear from 1.0×10^{-7} to 5.0×10^{-5} mol.L^{-1} of paraoxon, therefore the quantitative limit of detection was about 1.0×10^{-7} mol.L^{-1} of paraoxon. For semi-quantitative purposes a limit of about 1.0×10^{-8} mol L^{-1} can be considered. The relative estimated standard deviation (R.S.D) obtained using a 1.0×10^{-3} mol.L^{-1} acetylcholine solution and a 5.0×10^{-6} mol.L^{-1} paraoxon solution was $\pm$ 2.2% (n=8). For reactivating of the immobilized enzyme, 1,1'-trimethylene-bis(4-formylpyridinium bromide) dioxime (TMB-4) was used.

For higher a quantitative limit of detection, a stopped-flow system was used. The correlation between the peak height, and conductimetric signal is linear from 1.0×10^{-7} mol.L^{-1} a 5.0×10^{-9} mol.L^{-1} of paraoxon; therefore, the quantitative limit of detection was 5.0×10^{-9} mol.L^{-1} for the pesticide. The R.S.D. was 1.2% (n=6), obtained using a 1.0×10^{-3} mol.L^{-1} acetylcholine solution and a 4.0×10^{-8} mol.L^{-1} paraoxon solution.

A method was developed using spectrophotometric quantitative determination for both acetylcholine and paraoxon. The acetic acid formed by the reaction of acetylcholine and cholinesterase permeates through a PTFE membrane and is received by a stream of bromocresol purple (BCP) and is detected spectrofotometrically. Linearity for acetylcholine concentration and spectrofotometric response with a useful range from 1.0×10^{-4} to 5.0×10^{-3} mol.L^{-1} of acetylcholine was observed. The proposed procedure has a quantitative limit of detection of about 1.0×10^{-7} mol.L^{-1} of paraoxon, a linear range calibration of 5.0×10^{-7} to 5.0×10^{-5} mol.L^{-1}, and a R.S.D. of 1.7% (n=10) at 5.0×10^{-6} mol.L^{-1} paraoxon solution with a 5.0×10^{-3} mol.L^{-1} acetylcholine solution.

OBJETIVO:

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de um método condutimétrico de análise por injeção em fluxo para a determinação quantitativa de acetilcolina e de paraoxon, baseado na geração de ácido acético pela reação da acetilcolina com a enzima acetilcolinesterase quimicamente imobilizada em glass beads de porosidade controlada "CPG", e solução de 1,1'-trimetileno-bis(brometo de formilpiridina) dioxima (TMB-4) como substância recuperadora da atividade da enzima. Dentro da mesma proposta de trabalho, também teve como objetivo, a aplicação do método FIA-Stopped-Flow ao sistema condutimétrico, para permitir um maior tempo de contato entre a enzima e o pesticida, e portanto uma maior inibição, levando à resultados com sensibilidades maiores.

Também foi objetivo deste trabalho, o desenvolvimento de um método espectrofotométrico enzimático para determinação quantitativa de acetilcolina e de paraoxon, utilizando o indicador ácido-base (púrpura de bromocresol), para detecteção da mudança de pH devido à presença do ácido acético gerado pela reação enzimática.

Um estudo comparativo utilizando outro suporte para a imobilização também foi objetivo de nosso trabalho. Na determinação da acetilcolina pelo método condutimétrico, substituindo-se o "CPG" por sílica gel modificada.

AGRADECIMENTOS:

- Ao Prof. Dr. Matthieu Tubino, pela orientação segura e dedicada e pela amizade sincera e expontânea, meu reconhecimento e gratidão.

- Ao Prof. Oswaldo E. S. Godinho, pela co-orientação e lições de sabedoria e dedicação.

- Ao Prof. Graciliano de Oliveira Neto, pelas sugestões e valiosas discussões.

- Aos amigos e companheiros de laboratório: Adriana Vitorino, Adriana Magna, Elizabete, Lilly, Liu, Marta, Matias, Otávio.

- Às amigas Fátima e Nívea, pela agradável convivência, e sincera amizade.

- Aos meus amigos do Instituto de Química da UNICAMP, pela colaboração e amizade.

- Aos colegas e funcionários do Instituto de Química de UNICAMP, pelo auxílio e cooperação.

- Ao CNPQ e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

- A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese.

AOS MEUS PAIS E IRMÃOS,

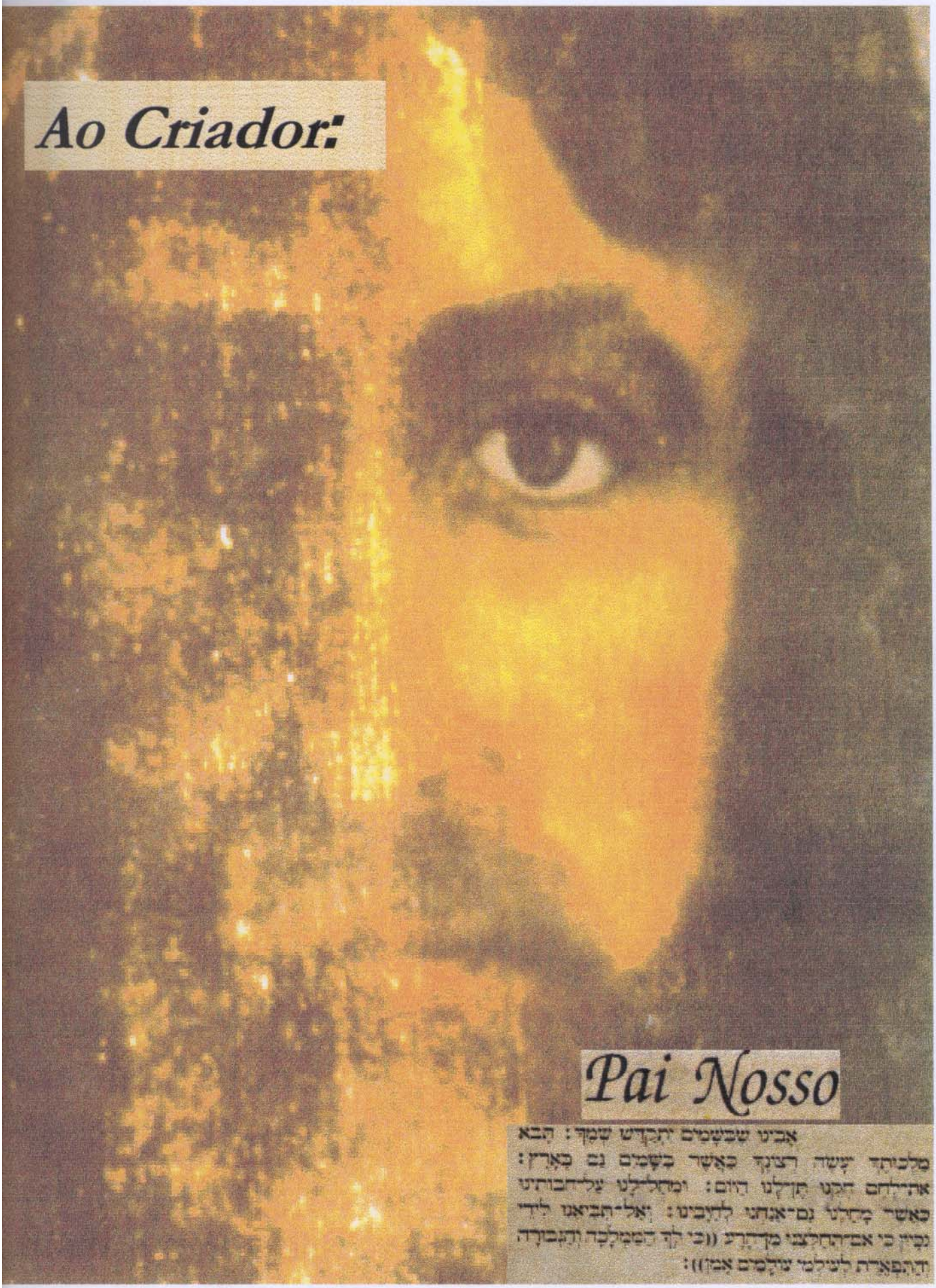
PELO APOIO E INCENTIVO.

AO LEONARDO

PELO ESTÍMULO E

COMPREENSÃO.

DEDICO:


Ao Criador:
Pai Nosso
אָבִינוּ שֶׁבַּשָּׁמַיִם יִתְקַדֵּשׁ שִׁמְךָ: תָּבֹא
מַלְכוּתְךָ יֵעָשֶׂה רְצוֹנְךָ כַּאֲשֶׁר בַּשָּׁמַיִם גַּם בָּאָרֶץ:
אֶת־לֶחֶם חֻקֵּנוּ תֵּן לָנוּ הַיּוֹם: וּמְחַל־לָנוּ עַל־חֲבוּתֵינוּ
כַּאֲשֶׁר מָחַלְנוּ גַּם־אֲנַחְנוּ לַחַיָּבִים: וְאַל־תְּבִיאֵנוּ לִידֵי
נִסָּיוֹן כִּי אִם־תַּחֲלִצֵנוּ מִן־הָרָע (כִּי לְךָ הַמַּמְלָכָה וְהַגְּבוּרָה
וְהַתִּפְאֶרֶת לְעוֹלְמֵי עוֹלָמִים אָמֵן):

Capítulo I

INTRODUÇÃO

I.1 - Transmissão de Impulsos dos Nervos às Fibras Musculares Esqueléticas.

I.2 - Mecanismo Catalítico da Acetilcolina.

I.3 - Fármacos que Inativam atividade da Colinesterase.

I.4 - Organofosforados como Inibidores da Enzima .

I.5 - Substâncias que Recuperam a Atividade da Enzima.

I. INTRODUÇÃO

I.1. TRANSMISSÃO DE IMPULSOS DOS NERVOS ÀS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS:

No sistema nervoso os impulsos nervosos são transmitidos através de células nervosas denominadas neurônios.

A comunicação entre os neurônios ocorre através dos axônios terminais de um neurônio e os dentritos de outro neurônio. Os dentritos recebem os sinais oriundos de outra célula. Estes sinais são transmitidos do axônio da célula transmissora para o dentrito da célula receptora.

O contato entre os neurônios, assim como entre os neurônios e as células musculares ou células glandulares, são chamados de sinapses. Em uma típica sinapse, a membrana pré-sináptica (por exemplo, o axônio de um neurônio) é separada da membrana pós-sináptica (por exemplo, o dentrito de outra célula) por um espaço chamado fenda sináptica[1-4].

Os impulsos nervosos se comunicam através da maioria das sinapses mediante transmissores químicos, que são pequenas moléculas difusíveis, como a acetilcolina (ACh) e a noradrenalina. A acetilcolina é também um transmissor nos terminais das placas motoras (conexões neuromusculares), que são uniões entre o nervo e o músculo estriado.

A chegada de um impulso nervoso dá lugar à liberação de acetilcolina na fenda sináptica. Então, a molécula de acetilcolina difunde até a membrana pós-

sináptica onde se combina com moléculas receptoras específicas abrindo poros na membrana, com diâmetros de aproximadamente 0,5 nm, suficientemente grandes para a passagem de cátions (Na^+, Ca^{++}, K^+) com bastante facilidade. Isto produz uma despolarização da membrana pós-sináptica, que se propaga ao lado da membrana eletricamente excitável da segunda célula nervosa. Porém, a acetilcolina é hidrolizada pela acetilcolinesterase em milésimos de segundos em ácido acético e colina, e se restabelece a polarização da membrana pós-sináptica[2] (Figura I.1).

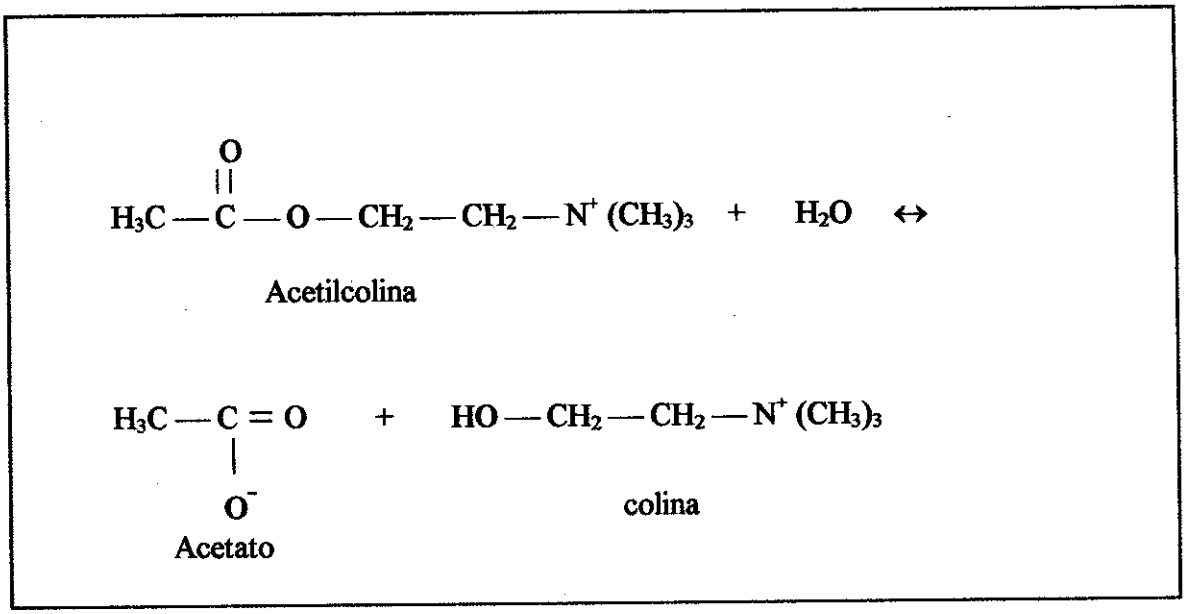


Figura I.1 - mecanismo da reação enzimática entre acetilcolina e a colinesterase

O período de tempo muito curto, cerca de 1×10^{-3} segundo, em que a acetilcolina permanece em contato com a membrana da fibra muscular é quase sempre suficiente para excitar a fibra muscular, e a remoção rápida da

acetilcolina evita uma nova excitação após a fibra muscular ter-se recuperado do primeiro potencial de ação.

A acetilcolina é sintetizada no citoplasma do terminal, porém, é rapidamente absorvida em várias pequenas vesículas sinápticas, cerca de 300.000 das quais existem normalmente em todos os terminais de uma única placa motora. Na matriz das fendas secundárias, há grande quantidade de enzima acetilcolinesterase (AChE), comumente denominada de forma reduzida como colinesterase (ChE), capaz de hidrolisar a acetilcolina (Figura I.2). Neste trabalho utilizaremos o símbolo AChE.

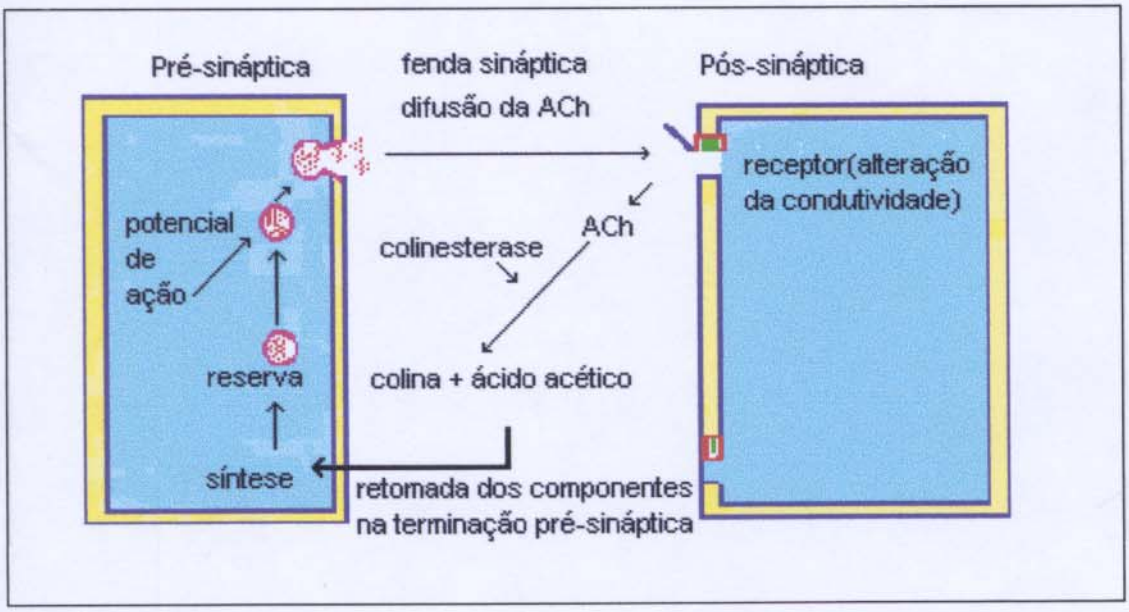


Figura I.2 - Ciclo das transformações da acetilcolina na placa terminal[2].

I.2 MECANISMO CATALÍTICO DA COLINESTERASE:

A reação catalítica entre a acetilcolina e a enzima colinesterase é representado na Figura I.3.

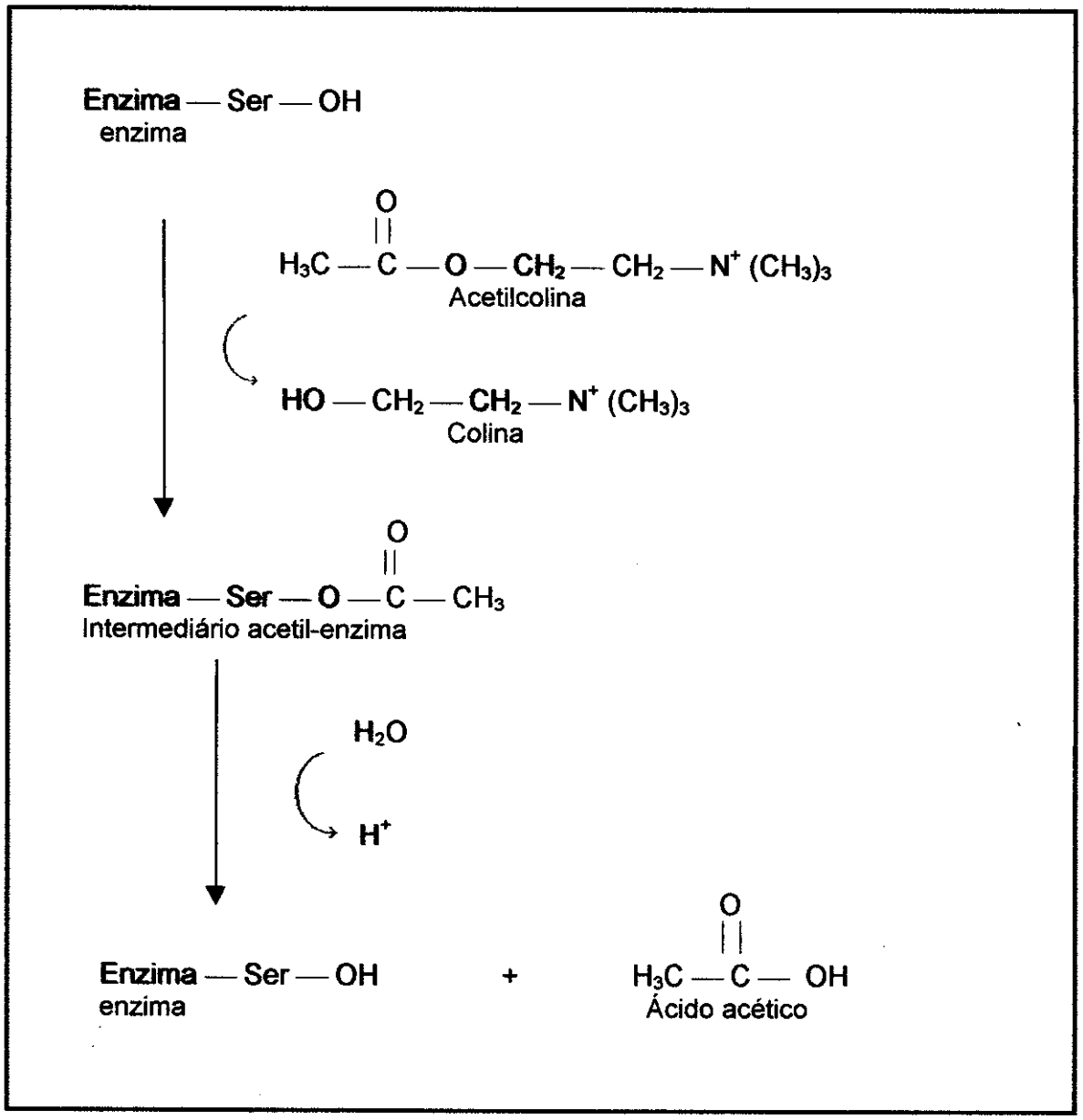


Figura I.3 – Reação Catalítica da acetilcolina pela colinesterase.

A acetilcolina reage com uma serina específica do centro ativo da AChE para formar um intermediário covalente acetil-enzima, ocorrendo assim, a liberação da colina. O intermediário acetil-enzima reage então com a água para formar acetato e regenerar a enzima livre o suficiente para iniciar uma onda de despolarização[1].

I.3 FÁRMACOS QUE INATIVAM A COLINESTERASE:

Devido ao importante papel fisiológico da acetilcolinesterase no sistema nervoso, os estudos dos inibidores da enzima são de grande importância.

No sangue, a AChE é inibida em vários graus por numerosos compostos, tais como organofosforados, carbamatos, ésteres, ácido sufônico[4].

Os processos de inibição enzimática são muito importantes porque são os principais mecanismos de controle em sistemas biológicos e são muito utilizados em diagnósticos e regulação enzimática pelos enzimologistas. Muitos medicamentos e agentes tóxicos agem inibindo enzimas[4].

Muitos inibidores assemelham-se ao substrato e ligam-se ao centro ativo da enzima[1], caracterizando a inibição enzimática que pode ser reversível e irreversível, dependendo do tipo de complexo formado com a enzima.

Um inibidor reversível caracteriza-se por uma dissociação rápida do complexo enzima-inibidor, enquanto que um inibidor irreversível caracteriza-se por dissociar-se muito lentamente da enzima.

A inibição da atividade da colinesterase na fenda sináptica, pelo emprego de substâncias inibidoras da enzima, pode levar ao bloqueio neuromuscular. Algumas substâncias, tais como a neostigmina e a fisiostigmina (também denominada eserina), inativam a ChE de tal forma que ela, apesar de presente nas sinapses, não hidrolisa a acetilcolina liberada pela placa terminal. Como resultado, a quantidade de acetilcolina aumenta após impulsos nervosos sucessivos, de maneira que quantidades extremas podem atingir o músculo, causando uma despolarização maior e mais demorada na membrana sináptica. Tal fato pode provocar a morte devido a um espasmo da laringe capaz de asfixiar a pessoa[1-4].

A neostigmina e a fisiostigmina combinam-se com a colinesterase, formando complexo carbamil-enzima, que é hidrolisado muito lentamente, inativando a enzima por várias horas[1] (Figura I.4).

Entretanto, doses controladas destas substâncias, e de outras inibidoras da colinestarase, são utilizadas como fármacos no tratamento de algumas doenças. A neostigmina e a fisiostigmina, por exemplo, são substâncias utilizadas no tratamento de pacientes portadores da doença miastemia grave que se caracteriza pelo mal funcionamento dos músculos.

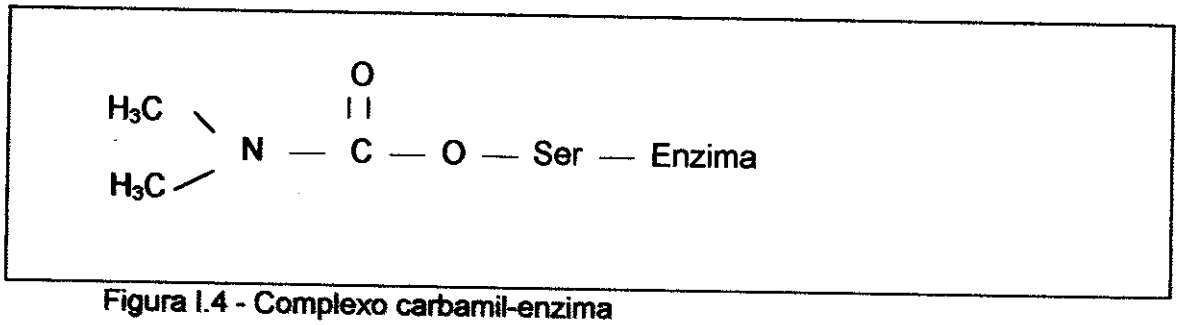


Figura I.4 - Complexo carbamil-enzima

A miastemia grave faz com que a pessoa fique paralisada. Acredita-se que a pessoa portadora desta doença, rara e auto imune, desenvolva anticorpos contra seus próprios músculos, lesando a fibra muscular, incluindo a destruição parcial da membrana receptora. Ocorre uma diminuição dos impulsos nervosos, devido à incapacidade das junções neuromusculares em transmitir sinais das fibras nervosas para as fibras musculares. Quando o mal funcionamento dos músculos atinge os órgão vitais, o paciente morre devido à paralisia dos músculos (p. ex. músculos respiratórios).

A neostigmina e a fisiostigmina impedem que a enzima destrua de imediato a acetilcolina secretada pela placa terminal. Desta forma, mesmo quantidades inadequadas de acetilcolina, secretadas pelas placas terminais, podem determinar uma quantidade de impulsos musculares quase normal.

A neostigmina também é utilizada no tratamento de glaucoma, uma doença ocular caracterizada por pressão intra-ocular anormalmente alta. Na terapêutica, a substância inibe a colinesterase, aumentado os efeitos da acetilcolina.

Entretanto, os fosforados orgânicos tais como diisopropilfosfofluoridato (DIPF) são os inibidores mais potentes da colinestarase.

O DIPF reage com um radical de serina no centro ativo da enzima, formando complexos covalentes fosforil-enzima muito estáveis (diisopropil-fosforil-enzima[1,4-8]). O grupo fosforil permanece ligado à serina do centro ativo da enzima (Figura I.5 e Figura I.6) .

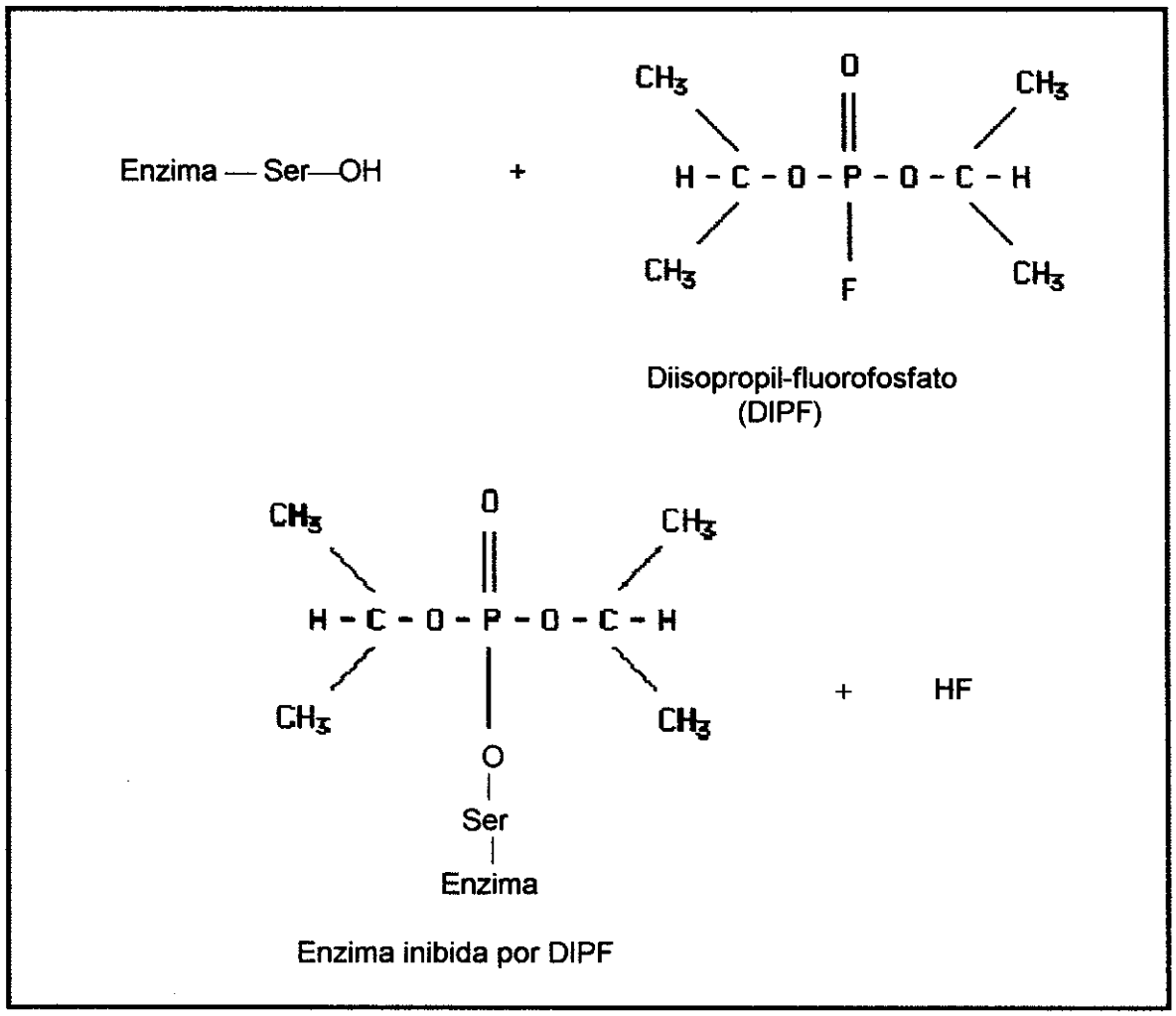


Figura I.5 - Inativação da Colinesterase por Di-isopropil-fluorofosfato[1].

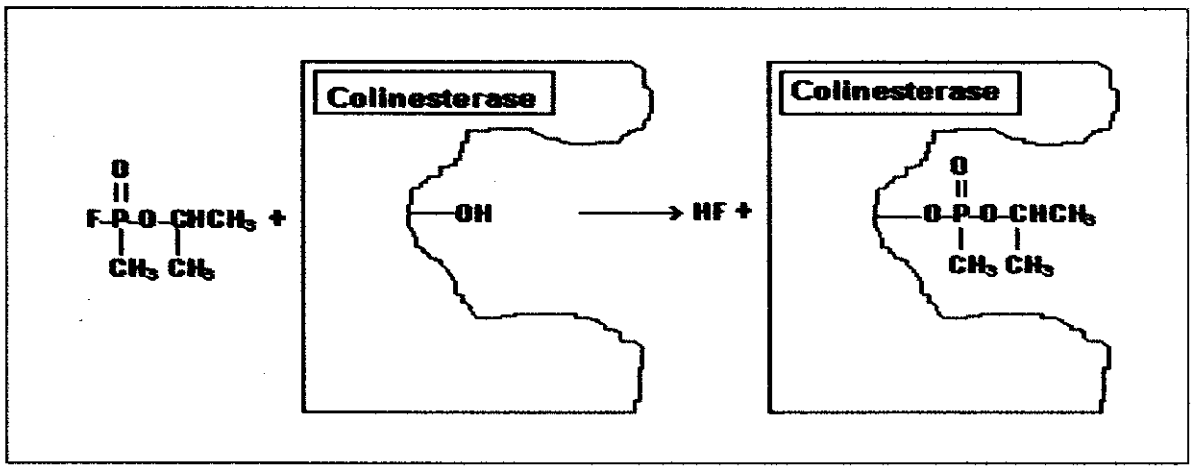
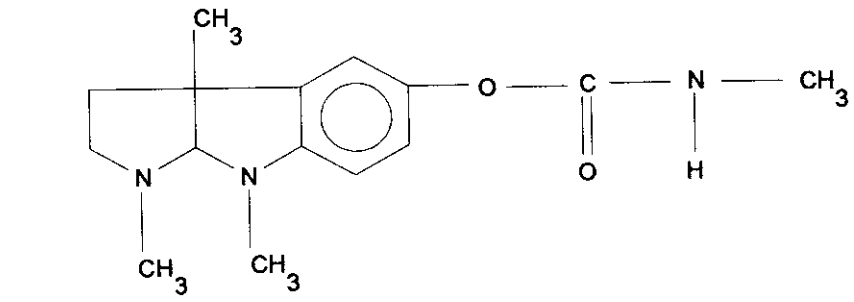
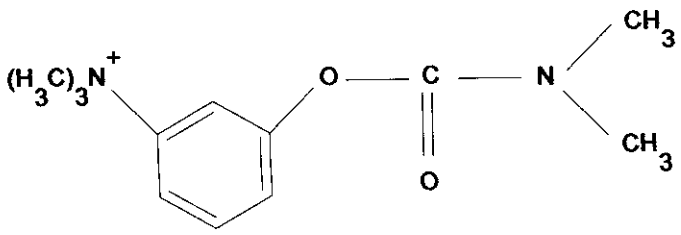


Figura I.6 – Esquema da Inativação da Colinesterase por Di-isopropil-fluorofosfato.

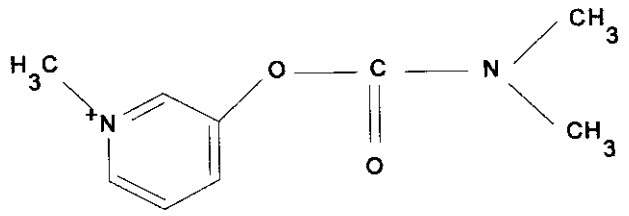
A Figura I.7 mostra alguns importantes compostos inibidores da colinesterase.



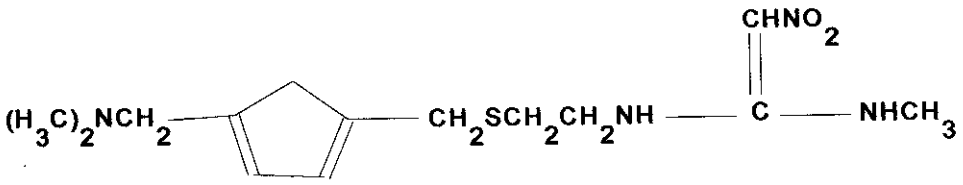
FISIOSTIGIMA



NEOSTIGMINA



PIRIDOSTIGMINA



RANITIDINA

Figura I.7 - Alguns Inibidores Reversíveis da Colinesterase.

O *diisopropilfosfofluoridato (DIPF)*, a *sarina* e o *tabum* são compostos que apresentam utilidade militar como gases neurotóxicos em guerra química. São capazes de inativar a colinesterase por várias semanas, causando paralisia respiratória, e desta forma levando a morte por sufocamento[1,4] . O *tabum* e a *sarina* (Figura I.8) estão entre os compostos inibidores da colinesterase mais tóxicos.

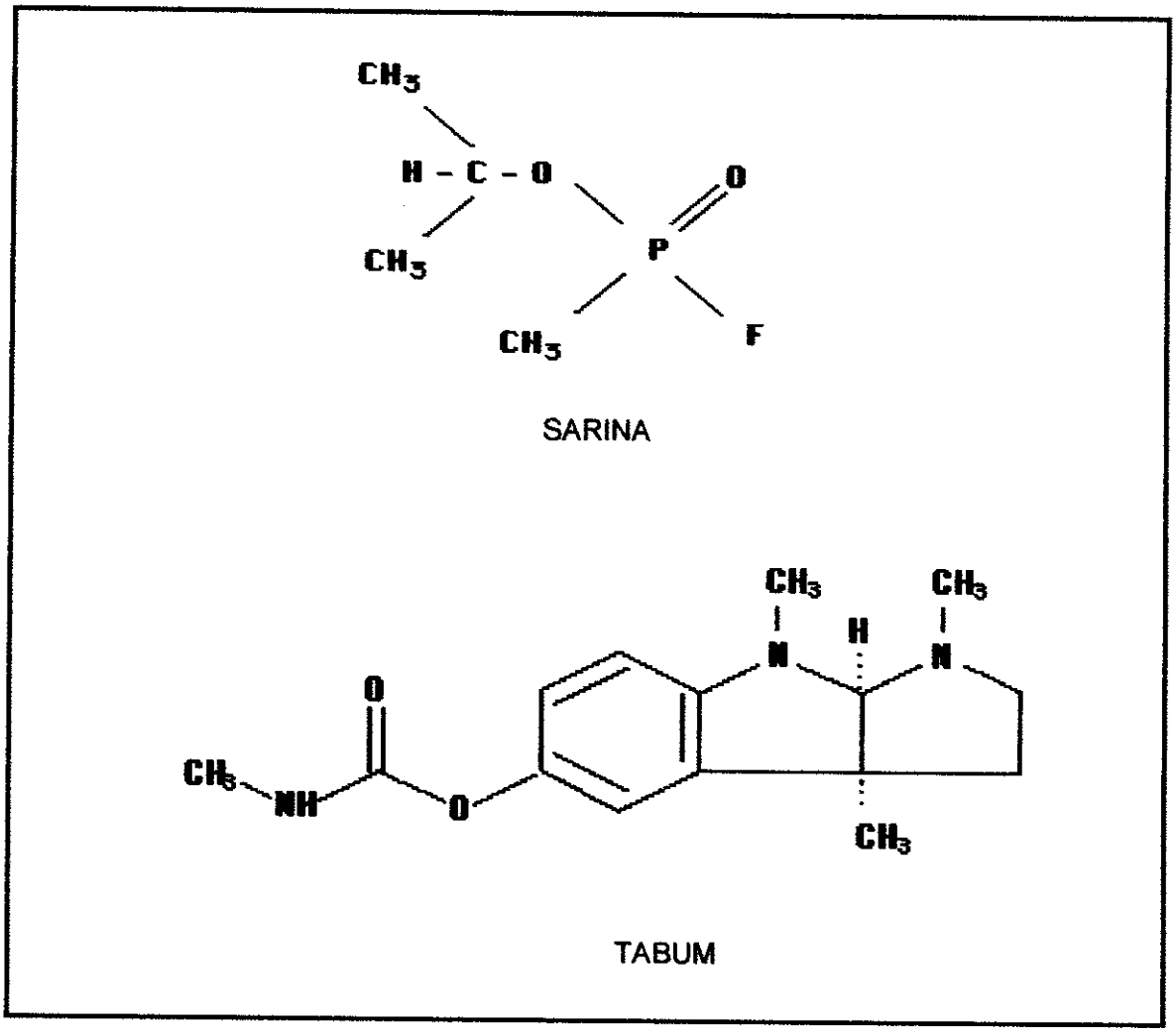


Figura I.8 - Alguns Inibidores Irreversíveis da Colinesterase.

Um esquema da hidrólise da *Sarina* é representado na Figura I.9.

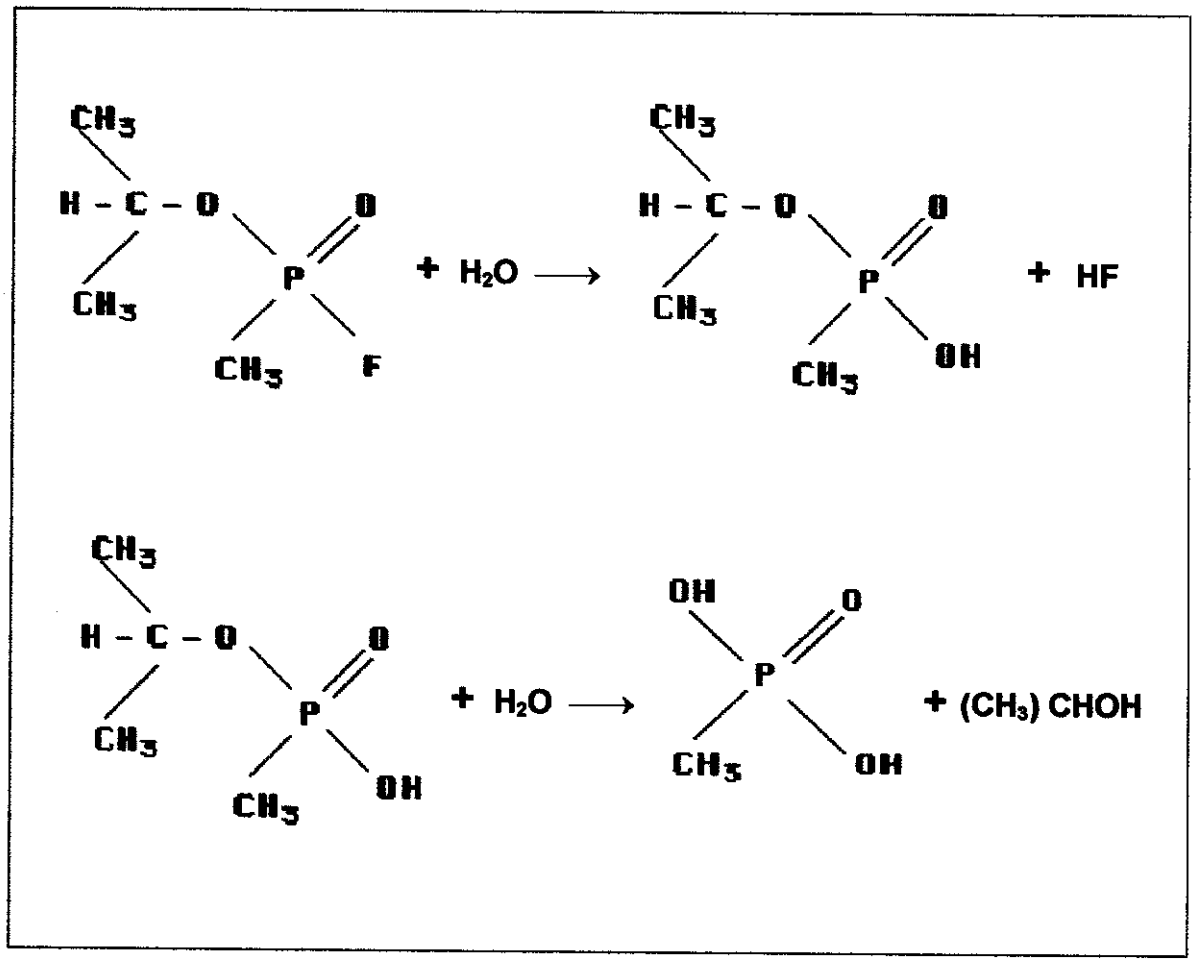


Figura I.9 - Reação de Hidrólise da Sarina.

1.4 ORGANOFOSFORADOS COMO INIBIDORES DA COLINESTERASE:

Compostos organofosforados são inibidores potentes da acetilcolinesterase. São compostos capazes de inibir irreversivelmente a AChE, bloqueando a serina do sítio ativo da enzima por um ataque nucleofílico, produzindo uma serina fosforilester, a qual é hidrolisada muito lentamente[1,3].

Inseticidas organofosforados e carbamatos são compostos com alta aplicabilidade na agricultura devido à sua capacidade de inativarem a acetilcolinesterase. O modo de ação dos inseticidas carbamatos é similar ao dos compostos organofosforados, exceto que com estes compostos a AChE é carbanilada. A inibição produzida pelos carbamatos não costuma ser irreversível e normalmente é de duração curta. Os distúrbios do sistema nervoso central são menos intensos e apresentam uma baixa toxicidade por via epidérmica.

Os agentes anticolinesterásicos organofosforados comumente encontrados são, com algumas exceções, líquidos altamente lipossolúveis e muitos apresentam pressões de vapor elevadas a temperaturas ordinárias. Os agentes menos voláteis são muito empregados como inseticidas agrícolas.

A Figura I.9 mostra alguns exemplos de pesticidas organofosforados mais utilizados.

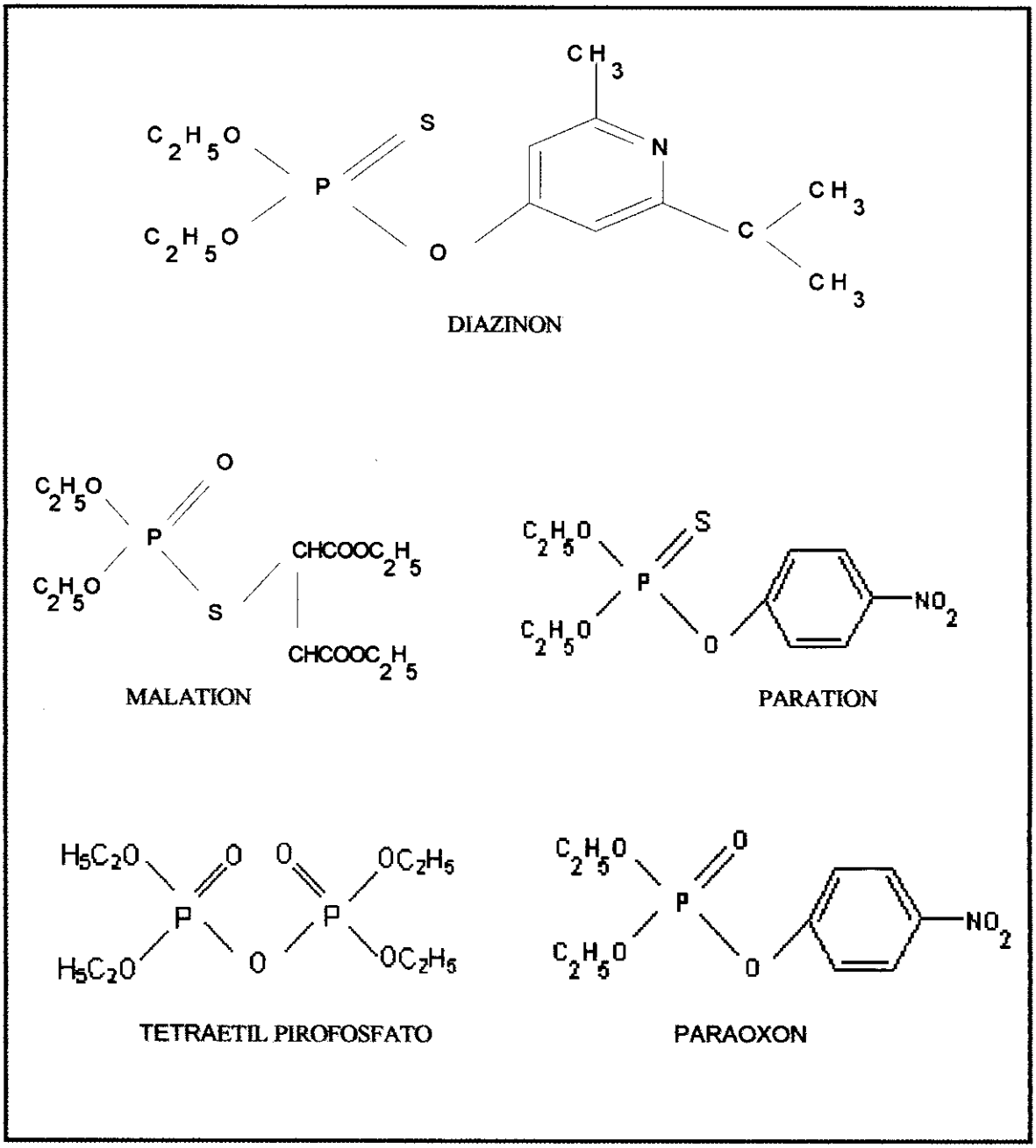


Figura I.9 - Exemplos de compostos organofosforados empregados como inseticidas.

1.5 SUBSTÂNCIAS QUE RECUPERAM A ATIVIDADE DA COLINESTERASE:

A acetilcolinesterase inibida por fosforados orgânicos como DIPF pode ser reativada por derivados da hidroxilamina (NH_2OH)[1] , a qual liberada o grupo fosforil, ligado ao grupo serina da enzima. Entretanto a hidroxilamina não pode ser utilizada in vivo por ser tóxica nas concentrações requeridas (Figura I.11).

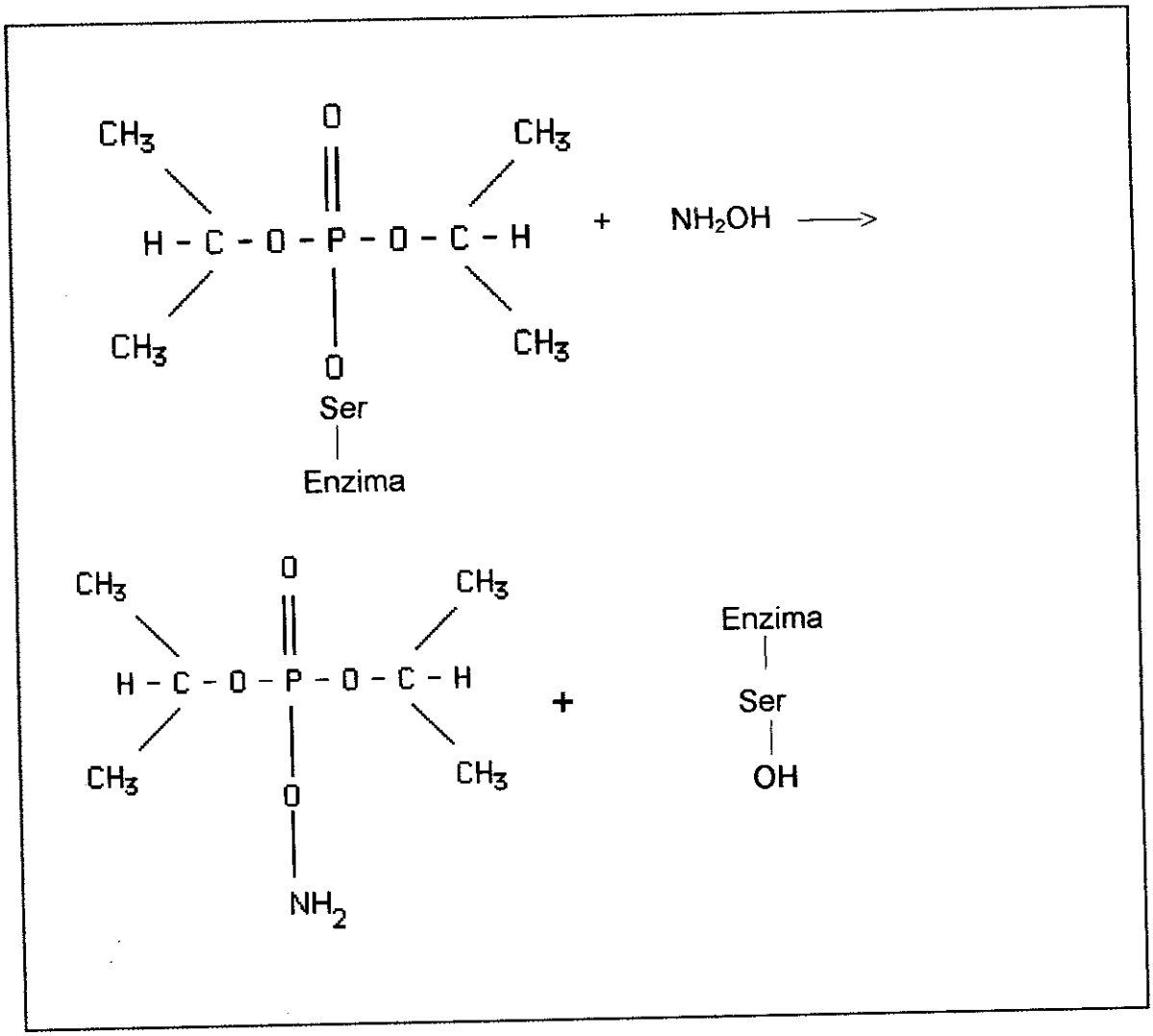


Figura I.11 : Reativação pela Hidroxilamina, da Acetilcolina Inibida por DIPF

Compostos organofosforados, incluindo os utilizados em envenenamento por gás neurotóxico, são absorvidos pelas vias epidérmica, digestiva e respiratória. No caso de intoxicação, o tratamento tem sido feito com drogas que são farmacologicamente antagônicas à acetilcolina. Como requisito terapêutico estas drogas devem reagir rapidamente com os gases neurotóxicos em determinados pH e temperaturas, reativando a enzima. Várias substâncias foram estudadas, e uma série de compostos reativadores da atividade da colinesterase foram indicados para o tratamento quimioterapêutico nos casos de envenenamento por compostos organofosforados[9].

Dentre os compostos reativadores da atividade da colinesterase após a enzima ter sido inibida por organofosforados estão algumas oximas[9-12].

Alguns autores[9-12] tem proposto a utilização de agentes nucleofílicos, tais como metiodeto de 2-piridinaldoxima (2-PAM iodeto) (Figura I.12), em métodos analíticos para a reativação da enzima imobilizada, após ter sido inibida por compostos fosforados.

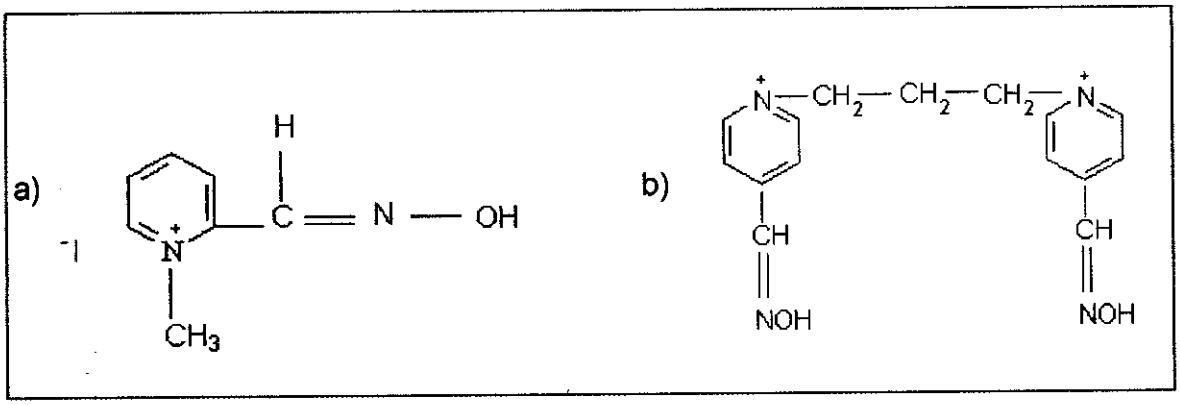


Figura I. 12 – Algumas substâncias utilizadas como regeneradores da enzima colinesterase, após a inibição com a enzima colinesterase. a) Metiliodeto de piridinaldoxima (PAM); b) [1,1'-trimetileno-bis(brometo de 4-formilpiridina) dioxima] ou TMB-4

Para o caso da inibição da enzima com DIFP o mecanismo de reativação por PAM pode ser explicado de acordo com a Figura I.13.

A substância PAM possui um íon amônio quaternário que atrai o sítio ativo da acetilcolinesterase inibida com organofosforado. O grupo hidroxilamina do PAM então atrai o grupo fosforil da enzima inibida, formando um complexo PAM-DIFP e reativando a enzima.

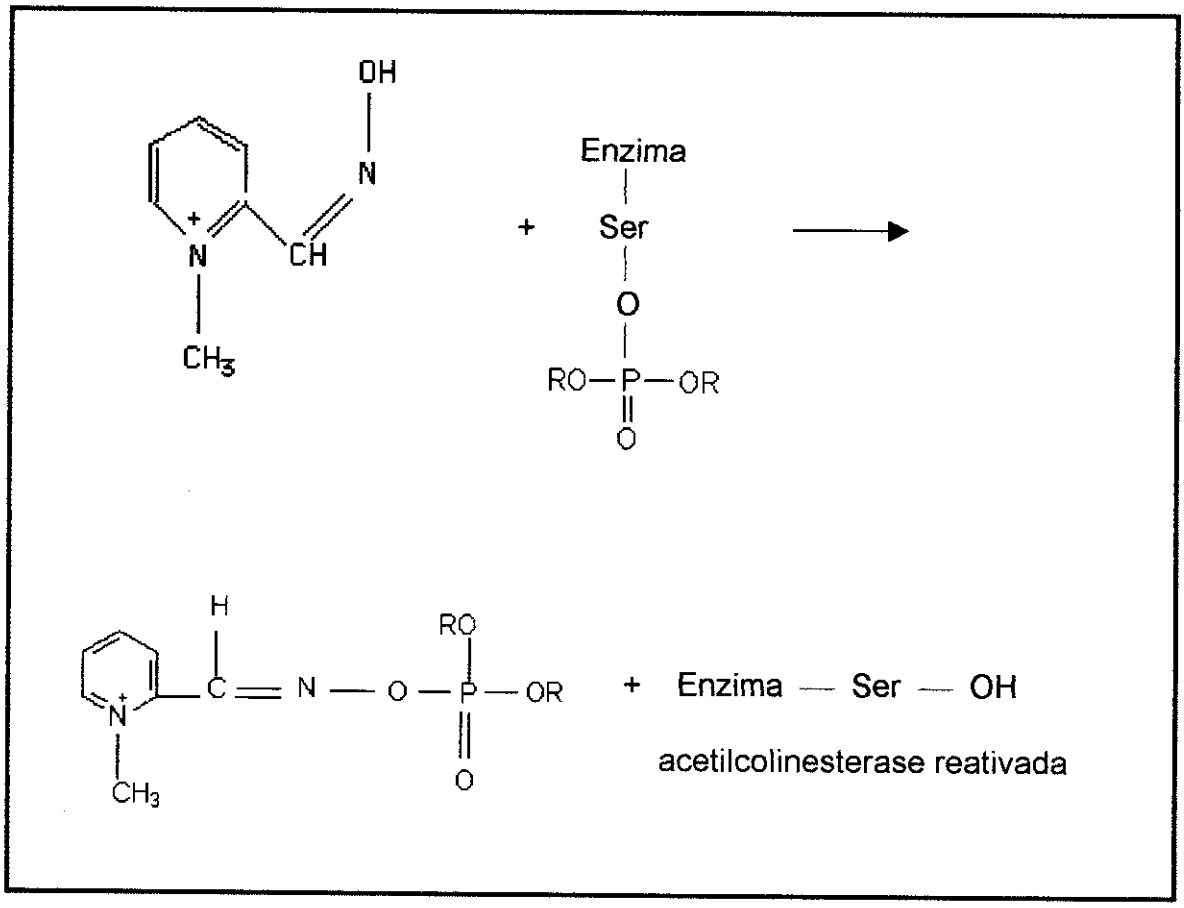


Figura I.13 - Reativação da acetilcolinesterase por PAM

Dentre os agentes nucleofílicos investigados, o TMB-4 [1,1'- trimetilieno-bis(brometo de 4-formilpiridina) dioxima] foi observado ser o mais eficiente agente reativador[1] (Figura I.12). O mecanismo de reativação de AChE inibida

por organofosforados utilizando TMB-4, da mesma forma que para o PAM, envolve fosforilação do reativador pela enzima fosforilada, desta forma liberando a enzima livre[9] (Figura I.13).

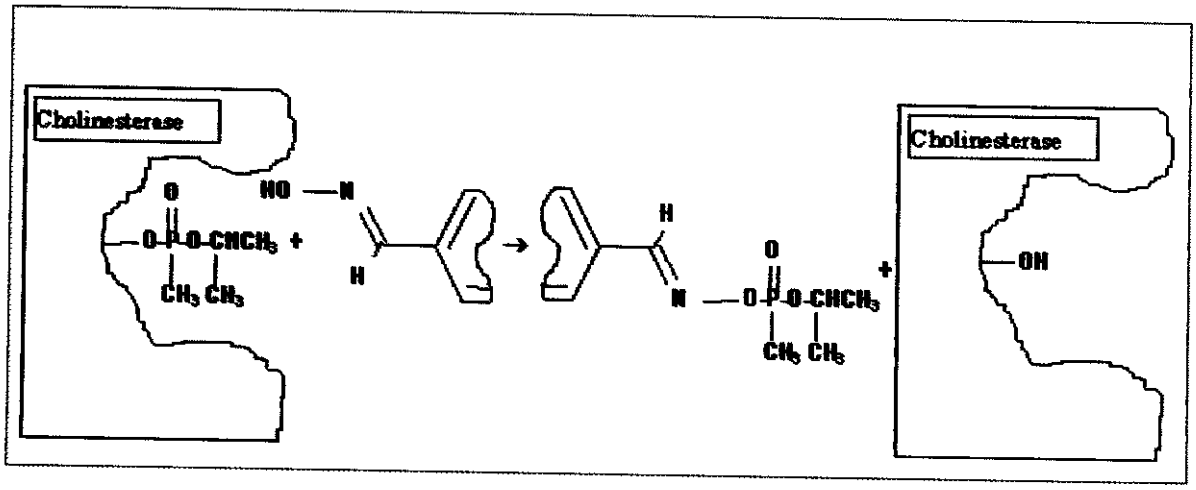


Figura I.13 – Esquema Geral da Reativação da Enzima Colinesterase.

Íons fluoreto, molibdato e magnésio também são reativadores de colinesterases fosforiladas. Embora sejam também agentes nucleofílicos, são reativadores muito diferentes dos anteriormente citados. O fluoreto de sódio, por exemplo, é cerca de 9 vezes menos efetivo que PAM na reativação da enzima inibida por sarina. Também é referido em literaturas que a adição de $MgCl_2$ é essencial para reduzir o decréscimo da atividade da enzima solúvel, ou imobilizada, quando a enzima é reutilizada repetitivamente[10]. Da mesma forma, o fluoreto de sódio ou o molibdato de amônio, têm sido usados em plasma inibido por sarina, embora a reativação seja mais lenta que quando utiliza-se PAM[9].

Capítulo II

BIOSSENSORES

II.1 - Definição.
II.2 - Aplicação.
II.3 - Métodos de Imobilização.
II.4 - Transdutores.

II. BIOSSENSORES

II.1 DEFINIÇÃO:

Essencialmente, um biossensor é um dispositivo miniaturizado integrando um elemento biológico ou bioquímico (anticorpo, enzima, receptor, célula, organelas, bactérias, tecido de plantas ou de animal) a um transdutor (óptico, eletroquímico, piezoelétrico, etc.), o qual converte a concentração de um analito, de uma amostra apropriada, em um sinal (óptico ou elétrico)[13-17] que pode ser ampliado e subsequentemente processado, fornecendo respostas automáticas.

Entretanto, devido à grande aplicação e às variedades de biossensores, os quais envolvem desde pequenos modelos portáteis até sistemas caros e automatizados, tornou-se um problema definir exatamente um biossensor[13-19].

Dado à problemas de definição, devido a ampla faixa de produtos que claramente estão dentro da categoria, Turner et al[14], adotaram uma definição mais abrangente de biossensores de trabalho que inclue aqueles que não estariam normalmente classificados dentro do título de biossensor.

II.2 APLICAÇÃO:

Os biossensores são uma ferramenta analítica bastante versátil. Devido à capacidade para determinar seletivamente analitos em amostras complexas, devido à rapidez de análise a baixo custo, constituem uma tecnologia com rápido crescimento de mercado. A rápida e fácil preparação, a possibilidade de miniaturização e a habilidade para serem utilizados em análises *in vivo* e em sistemas em fluxo, viabilizam sua aplicação em diferentes áreas tais como medicina, alimentos e ambiental[14-18].

Na medicina, os biossensores tem merecido considerável atenção, sendo muito empregados para a detecção e controle de algumas doenças e no monitoramento *in vivo* de metabólitos, drogas e proteínas. Usam-se sistemas miniaturizados portáteis em casos que necessitam um intenso acompanhamento médico[14]. É importante observar que os biossensores podem ser adequados para análises *in vivo*, desde que sejam tão pequenos que possam ser inseridos dentro do corpo ou em contato com o corpo para contínuo monitoramento da concentração de um analito de importância patológica ou terapêutica.

Já foram desenvolvidos métodos amperométricos e potenciométricos para a aplicação em análises clínicas na determinação de ácido úrico, para diagnóstico e tratamento de desequilíbrios hematológicos, de creatinina e creatina em fluidos biológicos, para diagnósticos de funções renais musculares e da tiróide. Sensores amperométricos também são muito utilizados em análises de colesterol, triglicerídeos, etanol, fosfato, fosfolipídeos, antígenos e anticorpos[14-25].

As enzimas imobilizadas, juntamente com sensores de eletrodos íon seletivo (EIS), são acoplados a vários instrumentos disponíveis comercialmente, para a determinação de uréia e creatinina[14].

Os sensores de glicose são importantíssimos no controle e diagnóstico de pacientes portadores de diabete e outros desequilíbrios de glicemia no sangue. Muitos trabalhos têm relatado o desenvolvimento de biossensores para a determinação desta substância em amostras reais[14,26,30-32].

Os eletrodos enzimáticos tem sido muito desenvolvidos para aplicação em análises clínicas na determinação de aminoácidos[14], bilirrubina[14,27], penicilina[14,28], oxalato[29] e de outras substâncias indicadoras de algumas doenças ou de toxicidade em diagnósticos clínicos.

Biossensores eletroquímicos estão sendo extensivamente investigados em processos bioquímicos, baseados na inibição enzimática, como, por exemplo, a determinação da acetilcolina (uma substância responsável pela transmissão dos impulsos nervosos no organismo) [32-42] e da atividade da colinesterase no sangue[43-54]. Como já foi dito, a concentração desta enzima no plasma sangüíneo é um importante indicador de doenças, e de processos de toxicidade com espécies tais como fluorofosfatos, carbamatos e pesticidas organofosforados[14].

A utilização de biossensores na medicina e outras áreas é ampla, e muitas substâncias podem ser analisadas, devido à sua alta especificidade, sensibilidade e potencial de miniaturização. Um vasto campo de aplicação está sendo estudado e desenvolvido, e muitos sensores são disponíveis

comercialmente para algumas áreas. A Tabela II.1 apresenta alguns eletrodos enzimáticos[23].

Tabela II.1 - Principais Eletrodos Enzimáticos Disponíveis Comercialmente

Tipo	Enzima	Sensor
Glicose	Glicose Oxidase	Pt (H_2O_2) , O_2 , I
Uréia	Urease	NH_3 , NH_4^+
Ácido Úrico	Uricase	O_2
Álcool	Álcool oxidase	O_2
L-Tirosina	Tirosina decarboxilase	CO_2
Oxalato	Oxalato oxidase	O_2
Salicilato	Salicilato hidroxilase	O_2
Creatinina	Creatininase	NH_3
Ascorbato	Ascorbato oxidase	O_2
L-Lisina	Lisina decarboxilase	CO_2
Açúcar	Invertase Mutarotase Glicose oxidase	Pt (H_2O_2) , O_2
Lactato	Lactato dehidrogenase	O_2
Penicilina	Penicilinase	pH

Na área de alimentos, devido ao alto número de análises requeridas em indústrias alimentícias, a pouca ou nenhuma necessidade de preparação da amostra, é um requisito favorável para os métodos que utilizam biossensores.

Sensores de glicose e oxigênio são ferramentas importantes empregadas em processos de controle de fermentação e monitoramento de vários substratos e produtos de reações bioquímicas[14,23]. Também é de grande importância, a determinação de etanol em alimentos, bebidas, e em processos de

fermentação. O processo de controle de qualidade de produtos alimentícios pode ser facilmente executado utilizando biossensores, para a medida de analitos tais como glicose , lactato, sucrose, galactose, metanol, aspartame e fenóis[14].

Em estudos ambientais, a preocupação crescente com o meio ambiente tem dirigido as pesquisas para o desenvolvimento de biossensores para poluentes, muitos trabalhos tem aparecido na literatura para detecção de compostos tais como fenóis, amônia, aromáticos clorados, formaldeído e pesticidas.

Nos últimos 15 anos, biossensores eletroquímicos tem sido amplamente investigados para a determinação de pesticidas, baseados principalmente na inibição enzimática de enzimas específicas. Uma variedade de organofosfatos, produtos à base de carbamatos e outros pesticidas podem ser detectados utilizando a enzima colinesterase interfaciada à transdutores ópticos e eletroquímicos[14].

Os biossensores podem ser diferenciados de acordo com o elemento biológico usado no receptor, que pode ser: organismo, anticorpo, tecido vegetal, organela, membrana, enzima e outros. Estes materiais biocatalíticos são intimamente ligados física ou quimicamente à eletrodos apropriados, e imersos em soluções que contêm o analito.

A grande variedade de reações em meios biológicos, associada à disponibilidade de vários transdutores, fornece grande variedade de opções

frente ao desenvolvimento de metodologias analíticas. Assim, deve-se fazer a escolha adequada do receptor biológico, do transdutor e estabelecer as condições ótimas para a reação que se deseja estudar.

II.3 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO:

O acoplamento do componente biológico ou bioquímico a um determinado material, conhecido como imobilização pode ser feito de diferentes maneiras. Os métodos de imobilização mais empregados na construção de biossensores têm sido adsorsão, ligação covalente, ligação covalente cruzada e inclusão[55-56].(Tabela II.2)

Tabela II.2 - Alguns Processos de Imobilização para Enzimas

Método	Vantagem	Desvantagem
Adsorção em uma matriz insolúvel (forças de Van der Waals, ligação iônica)	Simples, condições brandas.	Algumas das enzimas são ligantes muito dependentes do pH, solvente e temperatura.Insensibilidade.
Ligação covalente em suportes ou matrizes insolúveis em água.	Estabilidade do complexo suporte-enzima, uma vez que o material biológico é mantido em um ambiente semelhante ao que se encontra na natureza.	Possibilidade de perda de atividade devido a reações envolvendo grupos essenciais para a atividade biológica.
Ligação covalente cruzada por um reagente bi ou multifuncional	Procedimento simples, forte ligação química das biomoléculas.	Dificuldade para controle da reação, requer grande quantidade de enzima, atividade da enzima relativamente baixa
Inclusão em um gel (em uma matriz polimérica ou em uma membrana semi-permeável)	Condições brandas.	Perda da atividade da enzima por possibilidade de denaturação, ou lixivação devido aos diferentes tamanhos dos poros dos polímeros

Adsorção de uma enzima sobre uma suporte insolúvel, resulta em interações do tipo das forças de van der Waals, ligação iônica, atração via pontes de hidrogênio. Os suportes mais utilizados são o carvão vegetal, a sílica, o vidro e alumina. Geralmente, quando a imobilização é feita por adsorção, os biossensores são insensíveis. Entretanto, biossensores adequados podem ser construídos, conhecidos como eletrodos de pasta de carbono, utilizando uma mistura de grafite com a enzima previamente dissolvida em uma solução apropriada.

No método de ligação covalente, a enzima é mantida num ambiente semelhante ao que ela se encontra na natureza e, desta forma, possui maior estabilidade frente aos efeitos de pH, força iônica, solventes e temperatura. A imobilização em suportes insolúveis é feita através da ligação de grupos funcionais não ativos da enzima e grupos reativos (hidroxila, carbonila, amino e fenólico) ligados na superfície do suporte. O suporte com grupos NH_2 livres é ativado com glutaraldeído e em seguida o produto formado é acoplado com grupos NH_2 livres, da enzima. Os suportes mais utilizados são polímeros sintéticos (agar-agar, celulose, membranas de colágeno ou celulose, esferas de vidro, amido).

No método de ligação covalente cruzada, utiliza reagentes bifuncionais na imobilização do material biológico e também baseia-se na formação de ligações covalentes, entre si, porém na ausência de suporte. Ocorre formação

de ligações cruzadas intermoleculares entre as moléculas das enzimas e reagentes bi ou multifuncionais, com formação de partículas macroscópicas.

Dentre os reagentes bifuncionais utilizados para a formação da ligação covalente cruzada pode-se citar o glutaraldeído, o ácido bisdiazobenzidina 2,2-dissulfônico, 1,5-difluor 2,4 dinitrobenzeno e 2,2-isoanato 4-isotiocianato tolueno.

Diferentes mecanismos são utilizados para explicar o método de imobilização de ligação cruzada com o glutaraldeído[55]. A reação pode ocorrer entre os grupos aldeídos do reagente com grupos amino livres da enzima, formando um produto macromolecular. A reação também é possível entre amino grupos da proteína e um α, β-aldeído insaturado, o qual é formado pela dehidratação de uma solução aquosa de glutaraldeído[55]. Um esquema da reação do glutaraldeído é mostrado na Figura II.1.

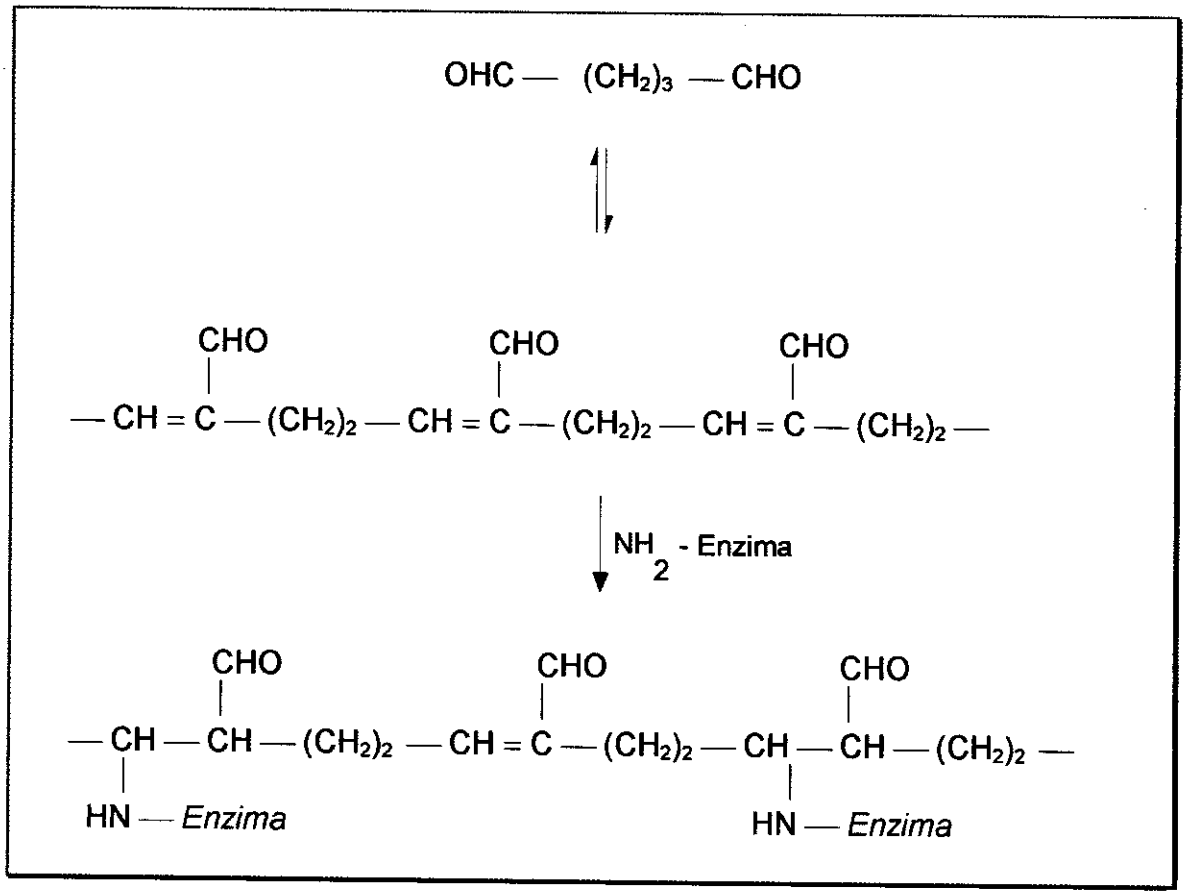


Figura II.1 - Imobilização de Enzima pelo Método da Ligação Covalente Cruzada Utilizando o Glutaraldeído.

No processo de inclusão, o material biológico é confinado na grade de uma matriz polimérica ou em membranas semi-permeáveis.

O método da oclusão em gel consiste no confinamento da enzima nos espaços intersticiais de polímeros (agar-agar, poliacrilamida, álcool polivinílico) ou membranas semi-permeáveis. Entretanto, nesta técnica pode ocorrer a perda da atividade da enzima por denaturação ou ainda pode ocorrer perda do material enzimático com lixação devido aos diferentes tamanhos dos poros do polímero.

II.4 TRANSDUTORES:

Essencialmente um biossensor é constituído de um componente biológico, um transdutor físico, um amplificador elétrico e um sistema de processamento de dados. Os transdutores são dispositivos os quais respondem aos produtos de uma reação ou de um processo enzimático e convertem o sinal físico-químico a um sinal elétrico.

Devido a sua simplicidade, transdutores eletroquímicos são muito empregados na construção de biossensores de baixo custo. Os sensores eletroquímicos mais utilizados normalmente são potenciométricos, amperométricos, ópticos e outros. O princípio de detecção consiste na conversão de um substrato não detectável em produto eletricamente ou opticamente detectável.

II.4.1 Sensores Potenciométricos:

O princípio básico de medidas potenciométricas é o desenvolvimento de potenciais sobre um eletrodo pelo acúmulo de cargas aumentando assim a densidade de carga na superfície de um eletrodo. Este processo ocorre pela medida do potencial de células eletroquímicas na ausência de uma corrente apreciável. O potencial desenvolvido é descrito pela atividade do analito em uma amostra através da equação de Nernst:

$$E = E_0 - (RT / nF) \, Ln \, a_i$$

E_0 é o potencial padrão para a_i = 1 $mol.L^{-1}$ (atividade iônica), R é a constante dos gases (8,3143V.coul.deg^{-1}.$mol.^{-1}$), F é a constante de Faraday (9687 coul.eg^{-1}), T é a temperatura em K , n é o número de elétrons envolvidos na reação.

Eletrodos de pH tem sido muito utilizados para medidas de atividades das enzimas tais como penicilinase[23], urease[14] e acetilcolinesterase[14], as quais produzem ou consomem prótons como resultado da catálise enzimática.

O usos de membranas íon-seletivas acopladas na interface do sistema enzimático de um transdutor pode resultar em um biossensor, capaz de medir a variação da concentração de alguns destes íons ou gases gerados pela reação entre a enzima e o substrato e inibidores de enzimas[57].

II.4.2 Sensores Amperométricos:

Sensores amperométricos mantém o potencial do eletrodo em um nível suficiente para a oxidação ou redução de espécies de interesse, quando uma voltagem é aplicada, e medem a corrente gerada devido à transferência de elétrons a qual deve ser proporcional à concentração do analito.

Biossensores amperométricos contam com um sistema enzimático que converte catalíticamente analitos eletroquimicamente não ativos em produtos que podem ser oxidados ou reduzidos sobre o eletrodo de trabalho que é mantido em potencial específico em relação ao eletrodo de referência. A

corrente é linearmente proporcional à concentração do produto eletroativo, o qual é proporcional ao substrato não eletroativo.

Enzimas tipicamente utilizadas em biossensores amperométricos são óxido-redutases, as quais catalisam a seguinte classe de reações[14]:

$$\text{Substrato (S)} + O_2 \rightarrow \text{Produto (P)} + H_2O_2 \quad (1)$$

Como resultado, a concentração do substrato pode ser determinada por detecção amperométrica do O_2 ou H_2O_2.

Alguns exemplos de aplicação de biossensores amperométricos incluem a imobilização de enzimas em membranas, tais como oxidases específicas para vários substratos, com produção de H_2O_2 , e fixando-as sobre superfícies de eletrodos redox.

A imobilização da enzima pode ser feita de diferentes maneiras:

a) em membranas fixadas sobre a superfície de eletrodos redox.

b) na superfície de eletrodos tais como de platina ou carbono vítreo.

c) em eletrodos modificados de pasta de carbono.

Assim, as possíveis alternativas da utilização de biossensores empregando transdutor amperométrico, traduz a versatidilidade do método, e tem motivado o desenvolvimento destes sensores buscando cada vez mais um aumento da sensibilidade e aplicabilidade na determinação de diferentes substâncias.

II.4.3 Sensores Ópticos:

Muitos trabalhos têm sido direcionados no sentido da utilização de sensores ópticos como transdutores no desenvolvimento de biossensores. Os transdutores ópticos geralmente se baseiam na detecção da variação de cor devido ao produto formado pela reação enzimática, ou pela reação do produto com um reagente, empregam um fenômeno óptico, incluindo absorção, luminescência, fluorescência, fosforescência, etc[18].

A escolha de um método óptico particular depende da natureza da aplicação e da sensibilidade desejada. Uma fibra óptica pode ser acoplada a todas as técnicas ópticas, aumentando assim sua versatilidade. Um sensor de fibra óptica é baseado no espalhamento, reflectância ou absorção de luz por uma_amostra posicionada no final de uma fibra óptica, com uma fonte de excitação e detector sendo locado próximo ao final da fibra.

Muitos sensores de fibra óptica tem sido desenvolvidos para a medida de pH, O_2 e CO_2 e estão sendo aplicados em sensores de gás, em análises de sangue *in vivo* e em cirurgias do coração[18].

A aplicabilidade dos sensores de fibras ópticas para monitoramento em tempo real e "in vivo", surge de sua capacidade telemétrica, e de sua habilidade para ter acesso a lugares difíceis de se atingir.

II.4.4 Sensores Condutimétricos:

A possibilidade do monitoramento de reações químicas por sensores condutimétricos está baseada na medida da mudança da condutividade da solução pelo consumo ou produção de espécies iônicas.

Reações enzimáticas que produzem ou consomem espécies iônicas, causando uma mudança na condutância da solução, podem ser empregadas em um sistema condutimétrico de determinação.

Vários eletrodos têm sido desenvolvidos como transdutores condutimétricos para biossensores e podem ser combinados com uma variedade de sistemas enzimáticos. Como exemplo, podemos citar a utilização de eletrodos cobertos com urease, acoplados a um eletrodo coberto com uma proteína inativa, para a determinação da medida da decomposição de uréia à amônio, bicarbonato e hidrólises de íons[18].

Uma característica deste método é justamente sua alta sensibilidade e facilidade de aplicação. Entretanto é importante observar que os resultados das determinações pelos métodos condutimétricos são alterados com pequenas variações da temperatura. Desta forma, faz se necessário um contínuo controle da temperatura do meio.

Capítulo III

Métodos Analíticos para Determinação de Pesticidas Organofosforados

III.1 – Pesticidas – Conceito e Aplicação.

III.2 – Danos causados ao Homem.

III.3 – Monitoramento de Pesticidas Organofosforados.

III.4 – Método de Determinação de Pesticidas Organofosforados.

III.5 – Métodos Enzimáticos para a Determinação de Pesticidas Organofosforados

III. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS:

III.1 PESTICIDAS - CONCEITO E APLICAÇÃO:

Defensivos agrícolas, ou agroquímicos, possuem várias denominações particulares tais como inseticidas, fungicidas, acaricidas ou herbicidas. Tais compostos são mais conhecidos como pesticidas (da palavra inglesa pesticides). Entretanto a palavra pest, em inglês não tem o mesmo significado de peste em português. Peste é o nome de uma doença do homem, transmitida pela pulga do rato, também conhecida como peste bulbônica, ao passo que pest, em inglês, significa praga. Daí também utilizar a palavra praguicida, ou biocida (o que mata seres vivos), ou organicida (o que mata organismos, ou seres vivos).

Desta forma, pesticidas, defensivos agrícolas e outras denominações, são compostos utilizados para combater ou controlar algumas pragas. São aplicados em alimentos durante o processo de produção, estoque, transporte ou venda. Alguns são empregados como agentes reguladores do crescimento de plantas, defolhantes, agentes para prevenir o amadurecimento prematuro de frutas. Aplicações químicas na plantação e nos produtos agrícolas são feitas antes e depois da colheita para diminuir o processo de deterioração do produto durante o transporte e estoque. Assim, estes compostos podem causar efeitos benéficos, evitando a deterioração, protegendo os produtos agrícolas (nosso

alimento) contra ataques de vegetais ou animais daninhos. Porém podem ser perigosos, pois muitos são muito tóxicos. Alguns podem causar câncer, infertilidade, doenças neurológicas e imunológicas, deficiências respiratórias, e até a morte, caso seja absorvido em quantidade igual ou maior do que a dose letal[78], além de alterar o equilíbrio da natureza, agindo como tóxicos perigosos também a outros animais.

Compostos organoclorados, tais como o diclorodifeniltricloroetano (DDT), não são degradáveis e possuem um efeito tão prolongado, que uma vez aplicados às paredes internas de uma casa, matam insetos por vários meses. Entretanto podem causar resistência biológica (processo de seleção), ou seja, na aplicação do inseticidas, morrem apenas os insetos sensíveis ao DDT, e permanecem aqueles resistentes. Por razões biológicas, ligadas à constituição de alguns insetos, estes não morrem quando em contato com o inseticida, proliferando muito depois de algumas gerações. Causam o mesmo efeito o BHC (hexaclorocicloexano), o clordano, o aldrin, e vários outros organoclorados[58].

O mecanismo de ação dos fosforados é um pouco diferente daquele dos clorados e das piretrinas. Apresentam uma vantagem, do ponto de vista ambiental, em relação aos clorados: a de serem degradados muito mais rapidamente pela natureza.

Os organofosforados podem ser divididos em dois grandes grupos: os exoterápicos, ou de contato, e os endoterápicos, também denominados sistêmicos, que são inseticidas que penetram nos vegetais, circulam com a seiva e envenenam qualquer inseto que se alimente dessa planta. Entre os

primeiros são muito conhecidos o paroxon, paration e malation; entre os sistêmicos estão o schradan ou "pestox", o demeton ou "sistox", o endotion, etc.

Há ainda uma terceira família de inseticidas sintéticos, que é a dos carbamatos, representados pelo isolane e pelo servin, alguns dos quais são tóxicos ao homem e a outros animais superiores. Os carbamatos também são compostos inibidores da colinesterase.

III.2 DANOS CAUSADOS AO HOMEM:

A ação nociva de toxicidade dos inseticidas ocorre tanto devido aos organoclorados (BHC, DDT), como no caso dos organosfosforados e carbamatos, causada por envenenamento devido a muitos acidentes.

A causa mais freqüente desses envenenamentos é a aplicação, por simples contato, sem os necessários cuidados. Como essas substâncias exercem poder tóxico por simples contato, é necessário que a pele, os olhos e as vias respiratórias do agricultor sejam protegidos durante a aplicação, através da utilização de capas plásticas, botas e luvas de borracha, capacetes e máscaras especiais. Em geral estas regras não são obedecidas pelo homem do campo.

Alguns inseticidas possuem efeito cumulativos no organismo, aumentando sua concentração ao longo da cadeia alimentar. Essas cadeias são cadeias ecológicas, isto é, processos que ocorrem no ambiente natural dos seres vivos.

Assim, os inseticidas podem ter ação cumulativa também no organismo humano, até atingir a dose tóxica. Este é o grande perigo das aplicações diárias, principalmente em ambientes fechados.

Além da absorção direta de inseticidas pela pele ou pelas vias respiratórias, há também, inúmeros casos de intoxicações por ingestão de alimentos contendo altas concentrações destas substâncias.

Portanto, é necessário um controle no sentido da utilização destes produtos, e uma série de medidas devem ser observadas e obedecidas, como medidas de proteção durante a manipulação, aplicação e estoque destes compostos, bem como a aplicação do produto em épocas corretas.

III.3 MONITORAMENTO DE PESTICIDAS:

O mecanismo de ação de pesticidas, sua alta toxicidade e seu amplo uso na agricultura para proteger as colheitas de pestes, pode representar um perigo para o equilíbrio no ecossistema. Desta forma, se faz necessário um contínuo e cuidadoso monitoramento destes compostos no ambiente.

Métodos sensíveis e rápidos para a detecção e determinação destas substâncias são muito importantes para a preservação do meio ambiente e para a saúde do ser humano.

III.4 MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS:

A evolução dos métodos de determinação de pesticidas, e particularmente dos organofosforados, é muito importante, uma vez que a utilização de pesticidas organofosforados (OP) tem aumentado muito na última década. De fato, estes compostos progressivamente tem substituído os inseticida organoclorados (DDT, aldrin, lindane). Pesticidas organofosforados são de baixa persistência no ambiente, mas têm uma alta e acurada toxicidade.

A detecção e determinação quantitativa de pesticidas organofosforados em diferentes matrizes pode ser desenvolvida por vários métodos baseados em muitas técnicas físico-químicas comumente empregadas para a identificação de compostos orgânicos (infravermelho, ultravioleta, cromatografia gasosa, cromatografia líquida, ou várias combinações deles)[57-59]. Entretanto, a busca por limites de detecção compatíveis com aqueles impostos pela lei para resíduos de pesticidas no ambiente, geralmente requerem tediosos procedimentos de extração e purificação, tornando estes métodos inviáveis para análises de rotina. Desta forma, nenhuma destas técnicas mencionadas é efetivamente utilizada no campo para monitorar os níveis de pesticidas.

Por outro lado, devido a sua praticidade, rapidez de resposta, seletividade, e diminuição de custos, a utilização de biossensores baseados na atividade ou inibição da colinesterase têm sido muito empregada, tanto para a determinação direta de enzima quanto para a determinação indireta de pesticidas. Sob o ponto de vista de economia de reagente e facilidade de

processamento, métodos enzimáticos convencionais podem ser drasticamente melhorados utilizando procedimentos mais efetivos para imobilização de enzimas, e métodos em fluxo[18].

Para a obtenção de métodos mais rápidos, se faz necessária a utilização de sistemas automatizados para a injeção da amostra. Isto pode ser conseguido utilizando um sistema de análise por injeção em fluxo.

Entretanto, em procedimentos que utilizam imobilização enzimática podem ocorrer sérios problemas quando a inibição é irreversível, pois a enzima perde gradualmente a atividade e se torna inútil após poucas análises. Este problema pode ser resolvido utilizando um reagente regenerador da atividade enzimática[10] ou um sistema automático de troca da coluna enzimática[11].

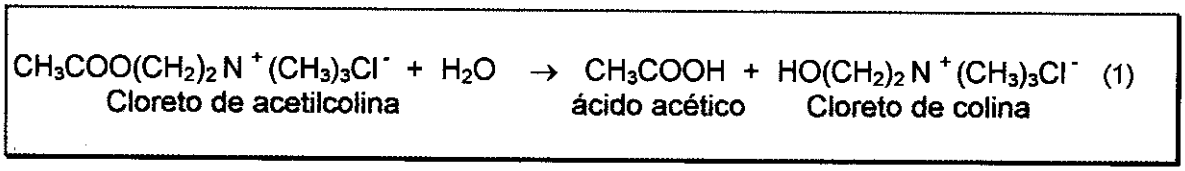
III.5 - MÉTODOS ENZIMÁTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS:

Recentemente muita atenção tem sido voltada para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos na determinação de pesticidas OP e compostos inibidores da colinesterase, devido à sua sensibilidade e especificidade, além da possibilidade do emprego de diferentes substratos para a acetilcolinesterase.

a) Eletrodos potenciométricos utilizados na determinação de pesticidas organofosforados:

Os transdutores potenciométricos respondem gerando um potencial na superfície de um eletrodo devido a uma espécie produzida na reação entre o analito e o material biológico[18,60-65].

A enzima é imobilizada em um suporte e este é fixado na superfície do eletrodo (transdutor). Após conectar a enzima-eletrodo ao pHmetro, a reação enzimática pode ser monitorada. A enzima hidroliza a acetilcolina, produzindo ácido acético e colina. Pesticidas organofosforados inibem irreversivelmente a enzima, diminuindo a atividade enzimática, resultando em um decréscimo do sinal potenciométrico. A detecção eletroquímica é estudada pela medida da mudança da concentração de ácido acético formado, que é diretamente proporcional à concentração de pesticida presente na amostra, de acordo com a reação (1) abaixo.



Recentemente, biossensores para esteres de colina, baseados na imobilização de uma esterase apropriada e na medida da mudança de pH (o qual diminui em função da formação de um ácido orgânico na hidrólise do éster, como é mostrado na reação (1)) utilizam eletrodo de vidro, ISFET[18,62-63] ou eletrodos de óxidos tais como Pd/PdO ou Ir/IrO_2. Trojanowicz e Hitchman[60]

determinaram pesticidas organofosforados utilizando butirilcolinesterase imobilizada em triacetato de celulose utilizado para cobrir uma superfície de um eletrodo metálico de óxido de irídio[18].

De uma maneira geral, os métodos potenciométricos estudados têm mostrado serem de fácil aplicação. Permitem também utilização de diferentes estragégias de imobilização das enzimas inibidas pelos pesticidas OP estudados[18]. Melhores limites de detecção foram conseguidos para paraoxon, malation e metil-paration (10^{-10} -10^{-9} mol.L^{-1}) com eletrodo de óxido, e para diisopropil-fluorofosfato (10^{-12} mol.L^{-1}) com um sensor ISFET[18].

b) Biossensores Amperométricos:

Recentemente muitos métodos amperométricos têm sido desenvolvidos para a determinação de pesticidas organofosforados[66-88].

A determinação amperométrica de pesticidas organofosforados tem sido feita pela medida do peróxido de hidrogênio formado, pela medida da concentração de oxigênio consumido, ou na medida direta de colina ou tiocolina, de acordo com a reação (2).

$$\underset{\text{Cloreto de colina}}{HO(CH_2)_2\,N^+(CH_3)_3\,Cl^-} + O_2 \xrightarrow{ChOD} \underset{\text{Cloreto de hidrobetaína}}{HO_2C(CH_2)\,N^+(CH_3)_3\,Cl^-} + \underset{\text{Peróxido de hidrogênio}}{2H_2O_2} \quad (2)$$

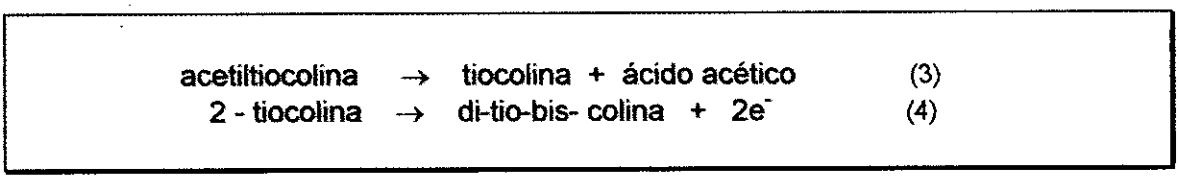
BIBLIOTECA CENTRAL

Quando um método amperométrico é utilizado na detecção de pesticidas OP, uma ou duas enzimas podem ser utilizadas. Se o sistema utiliza AChE e colina oxidase, o transdutor interno pode ser um sensor de oxigênio ou de peróxido de hidrogênio.

A formação de H_2O_2 é baseada na seqüência das reações (1) e (2). A adição de compostos organofosforados causa um decréscimo da atividade da acetilcolinesterase e consequentemente um decréscimo da quantidade de peróxido de hidrogênio liberado. A medida da corrente devido à oxidação de H_2O_2 é proporcional à concentração de pesticida presente[18].

Pesticidas tais como paraoxon, paration e metil-paration também têm sido determinados quantitativamente, utilizando acetilcolina como substrato e butirilcolina-esterases. Os resultados mostram que a atividade da acetilcolinesterase é maior que butirilcolinesterase[71].

Com o objetivo de melhorar a sensibilidade e reprodutibilidade dos métodos, têm sido utilizado diferentes substratos para acetilcolinesterase [71,72]. Recentemente a atividade da AChE foi determinada um utilizando método amperométrico baseado na saponificação do tioéster acetiltiocolina a tiocolina e ácido acético[72], de acordo com as reações (3) e (4).



Da mesma forma que os métodos potenciométricos, os amperométricos têm mostrado, de uma maneira geral, ser de fácil aplicação. Permitem também a utilização de diferentes estragégias de imobilização das enzimas inibidas pelos pesticidas OP estudados[18].

c) Biossensores Condutimétricos:

Normalmente os métodos condutimétricos para a determinação de pesticidas OP, utilizam um fino filme de uma colina-esterase imobilizada na superfície de dois eletrodos metálicos, por exemplo um de cromo e outro de ouro. A diferença de condutividade é medida pela formação de ácido acético na solução de acordo com a reação (1). A concentração de pesticida é proporcional ao decréscimo da concentração ácido acético formado, após a inibição da enzima pelo organofosforado, e diretamente proporcional à mudança de condutividade da solução.

Alguns métodos propostos têm mostrado bom limite de detecção (cerca de 10×10^{-7} mol.L^{-1} para o paraoxon)[89], além da facilidade de aplicação, baixo custo, e possibilidade de diferentes estratégias de imobilização[89-93].

d) Biossensores Ópticos:

Muitos métodos colorimétricos, espectrofotométricos, fluorimétricos freqüentemente utilizam a acetilcolina ou acetiltiocolina como substrato. O ácido acético é produzido pela reação enzimática, e é determinado quantitativamente

na presença de um indicador ácido-base, pela mudança de cor do indicador em função da mudança do pH[12]. Outros utilizam um substrato sintético, que reage com a colinesterase produzindo produtos coloridos, medindo-se a absorção do sistema em um determinado comprimento de onda[94-96].

O emprego de fibra-óptica para determinação de inibidores da colinesterase torna possível o desenvolvimento de medidas em longas distâncias e em lugares inacessíveis. Geralmente incluem um LED como uma fonte de luz e um fotodiodo como detector[97,98].

Capítulo IV

Procedimento Experimental

IV.1 – Aparelhagem.

IV.2 - Reagentes.

IV.3 - Imobilização da Enzima.

IV.4 - Construção da Coluna Enzimática.

IV.5 - Sistema FIA Utilizado.

IV. PARTE EXPERIMENTAL :

IV.1 EQUIPAMENTOS:

- Bomba Peristáltica; Ismatec MP13 GJ4
- Registrador; Cole Parmer
- Condutivímetro; Micronal; modelo B331
- Espectrofotômetro; Carl Zeiss; modelo PM2D
- Membrana de PTFE[10]
- Cela de permeação[99]
- Tubos de Tygon; 2mm. de diâmetro interno (d.i.)
- Tubos de Polietileno
- Cela de condutividade[100]
- Válvula introdutora de amostra[101]

IV.2 REAGENTES:

- Acetilcolinesterase; Sigma (E.C.3.1.1.7); tipo VI-S; nº C-3389; lote 49F-80801.
- *Cloreto de Acetilcolina; Sigma; nº A 6625; lote 114F-0349*
- Paraoxon; Sigma; 95%; nº D-9286; lot 65H1227

- 1,1' - trimetileno - bis (bometo de formilpiridina) dioxima ; Sigma; nº T-6509; lot 102H5024
- 3 - *aminopropiltrietoxisilano*, 98%; Aldrich; nº 919-30-2
- Ácido Sulfúrico; Merk, P.A.
- Ácido Fosfórico; Merk, P.A.
- Ácido Nítrico; Chenco, grau analítico
- Ácido Acético; Ecibra, grau analítico
- P-aminopropiltrietoxisilano; Aldrich
- Solução de Glutaraldeído, Aldrich, 15%
- Púrpura de bromocresol[102,103] ;
- Fosfato de potássio monobásico; Nuclear, grau analítico
- Fosfato de sódio dibásico; Nuclear, grau analítico
- CPG – 240, 80 -120 mesh, porosidade 22,6 nm, Sigma Chemical.
- Sílica Gel modificada, 70 - 220 mesh, Sigma Chemical.

IV.2.1 Preparação da Solução Tampão Fosfato 0,1mol.L^{-1} :

Preparou-se uma solução de fosfato de potássio monobásico dissolvendo-se 7,8 g em água deionizada previamente fervida e esfriada, completando-se o volume para 500 mL em um balão volumétrico. Outra solução de fosfato de sódio dibásico foi preparada a partir da dissolução de 0,91 g do sal em água, completando-se o volume para 500 mL em um balão

volumétrico. As duas soluções foram misturadas e o pH da solução final foi corrigido para 8,00 (pHmetro – eletrodo de vidro conjugado) utilizando solução de hidróxido de sódio, gota à gota.

IV.2.2 Preparação das Soluções de Acetilcolina:

Foi preparada uma solução estoque $1,0x10^{-3}$ mol.L^{-1} de cloreto de acetilcolina, dissolvendo-se 0,082g do sal em tampão fosfato 0,1 mol.L^{-1} de pH = 7,0. As soluções de acetilcolina de outras concentrações foram obtidas a partir da diluição desta solução, sempre com solução tampão. Devido à hidrólise da acetilcolina uma nova solução era preparada a cada novo dia de trabalho.

IV.2.3 Preparação das Soluções de Paraoxon:

Foi utilizado Paraoxon (95% de pureza) para preparar uma solução estoque $6,0x10^{-3}$ mol.L^{-1} em acetona[95]. As soluções padrões foram preparadas pela diluição em tampão fosfato. Uma nova solução estoque era preparada à cada série de medidas.

IV.2.4 Preparação das Soluções de TMB-4:

As soluções de TMB-4 utilizadas foram preparadas a partir de uma solução estoque $5,0 \times 10^{-3}$ mol.L^{-1} em acetona. As soluções padrões foram

preparadas pela diluição em tampão fosfato 0,1 mol.L^{-1} de pH = 7,0. Uma nova solução estoque era preparada à cada série de medidas.

IV.2.5 Preparação da Solução de Púrpura de Bromocresol:

Solução de púrpura de bromocresol[101] (PBC) $1,0\times10^{-4}$ mol.L^{-1} foi preparada pela dissolução de 0,27 g de PBC em etanol, e o volume completado para 500 mL com água. 50 mL desta solução foi diluída com água para 500 mL para obter a solução de trabalho. O pH foi ajustado para 7,0 pela adição de solução de NaOH diluído, gota à gota. Para evitar a absorção de CO_2 do ar, a solução de PBC foi colocada em um frasco protegido por um tubo contendo $CaCl_2$ - NaOH - $CaCl_2$ de modo que o ar ingressante estivesse isento deste gás (Figura IV.1).

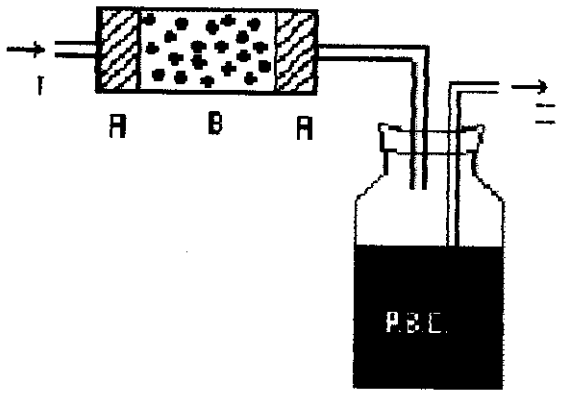


Figura IV.1 – sistema reservatório de solução de púrpura de bromocresol (PBC). A: $CaCl_2$ sólido; B: NaOH em partilhas; I : entrada de ar; II: fluxo de solução de PBC para o sistema FIA.

IV.3 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA:

Foram feitos estudos com dois métodos diferentes de imobilização da enzima ChE. O primeiro método consiste em imobilizar a enzima em CPG[95] e foi aquele adotado em nosso trabalho. Um método comparativo foi feito com imobilização da enzima em sílica gel[104] .

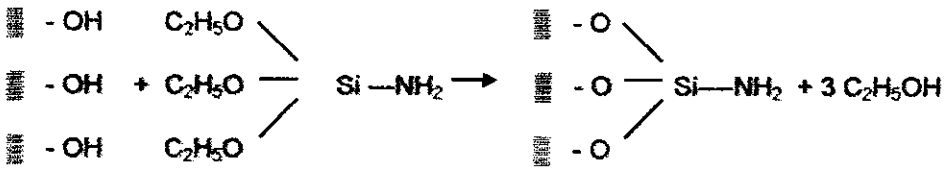
IV.3.1 Imobilização da Enzima em CPG:

a) Limpeza do CPG:

Pesou-se cerca de 0,2 g de CPG que foram, em seguida, adicionadas em uma solução de 10 mL de ácido nítrico 5%. A mistura foi levada a fervura durante 30 minutos. Posteriormente o glass beads foi filtrado em um filtro de porcelana porosa, lavado com água deionizada e seco em estufa a 95 ^{o}C.

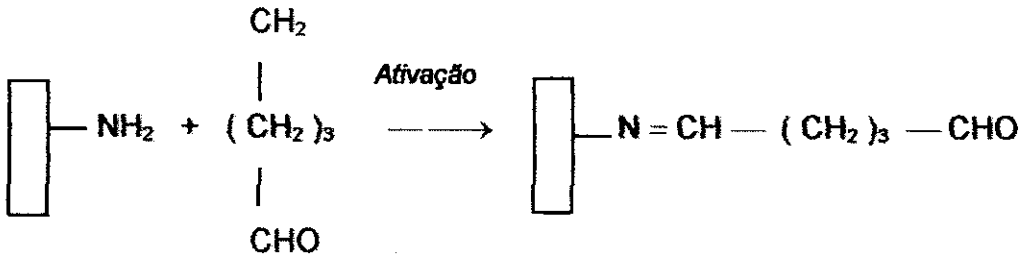
b) Alquilação do CPG via silanização:

Para a silanização do CPG foi preparada uma solução de 1,0mL de 3-aminopropiltrietoxisilano e 9,0mL de água, com o pH ajustado para 3,45 com ácido clorídrico 5,0 mol.L^{-1}. O "CPG" seco foram adicionados à esta solução, o pH foi reajustado para 3,45 e a mistura foi levada a 75 ^{o}C em banho de água por 150 minutos, com agitação a cada 15 minutos. O "CPG" silanizados foram filtrados, lavados e secos.



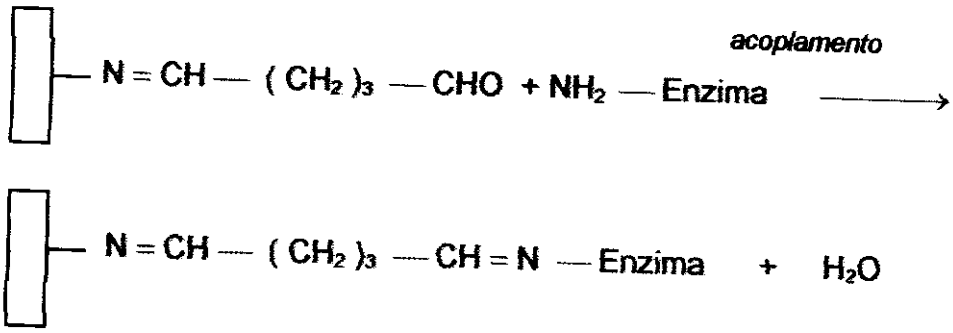
c) Acoplamento com glutaraldeído:

O agente ligante (solução de glutaraldeído 2,5%) foi preparado pela adição de 2,5mL de solução de glutaraldeído (50%) em um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com solução tampão fosfato 0,1 $mol.L^{-1}$, pH 7,0. A solução obtida foi adicionada ao CPG em um becker de 50 mL e a reação foi continuada sob agitação e em temperatura ambiente por 30 minutos. O "CPG" ativadoS foram filtrados e lavados várias vezes com água destilada.



d) Imobilização da enzima nos CPG:

A acetilcolinesterase (1,0 mg - 1000 U) foi dissolvida em 1,0 mL de tampão fosfato (0,1 mol.L^{-1}, pH 8,00) frio (4°C) e adicionada aos "CPG". A solução foi deixada em repouso por 2,5 h a 4°C. A enzima imobilizada foi lavada primeiramente com tampão fosfato e posteriormente com água deionizada. A enzima imobilizada foi estocada em tampão fosfato em uma geladeira a 4°C para uso posterior.



IV.3.2 Imobilização da Enzima em sílica gel modificada:

A preparação da sílica gel modificada (limpeza, alquilação, acoplamento do glutaraldeído) foi feito como descrito por Kubota[104].

A imobilização da acetilcolinesterase em sílica gel modificada foi efetuada utilizando o mesmo procedimento anteriormente descrito para a imobilização em "CPG" (1,0 mg -1000 U da enzima e 0,2 g de sílica gel modificada).

IV.4 CONSTRUÇÃO DA COLUNA ENZIMÁTICA:

A enzima imobilizada em CPG foi colocada em uma coluna de polietileno (10,0 mm d.e. x 3,0mm d.i.) até 3,0 cm de comprimento. A coluna enzimática foi estocada em geladeira a 4°C imersa em tampão fosfato.

A enzima imobilizada em sílica gel modificada também foi colocada em uma coluna de polietileno de mesmo diâmetro (10,0 mm d.e. x 3,0mm d.i.) e comprimento (3,0cm). Da mesma forma, a coluna enzimática foi estocada em geladeira a 4°C, imersa em tampão fosfato, para preservação da atividade da enzima.

IV.5 SISTEMA FIA UTILIZADO:

IV.5.1 Determinação de Acetilcolina pelo Método Condutimétrico:

O método se baseia na medida da concentração do ácido acético formado pela passagem de solução de acetilcolina através de um reator contendo colinesterase imobilizada em "glass beads". O ácido acético formado, como produto da reação enzimática, é conduzido por um tampão fosfato 0,1mol.L^{-1} (pH=8,00) e permeado através de uma membrana de PTFE para um fluxo de água deionizada. A medida de condutividade é feita em uma cela de condutância[100] acoplada a um condutivímetro. Os resultados foram registrados num registrador potenciométrico. A relação entre a condutividade

e a concentração do ácido acético formado é linearmente proporcional à concentração de acetilcolina presente na amostra, na faixa estudada[102].

Um diagrama esquemático para a determinação de acetilcolina é representado na Figura IV.2. A amostra de acetilcolina é injetada (A), transportado pelo tampão fosfato (A_1) e passa através de um reator enzimático (RE). A acetilcolina reage com a colinesterase imobilizada no reator, formando ácido acético em meio tampão fosfato. Posteriormente a solução é misturada com ácido sulfúrico (A_2) e, então, o ácido acético difunde através de uma membrana de PTFE sendo conduzido por um fluxo de água deionizada (A_3) para uma cela condutimétrica (C).

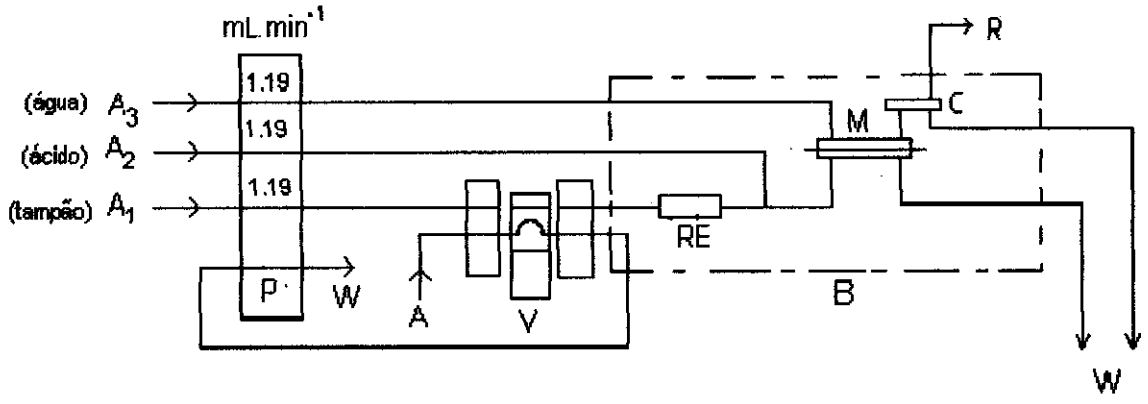


Figura IV.2 - A_1 , fluxo de tampão fosfato 0,1 mol.L^{-1} ; A_2 , solução de ácido sulfúrico 2,0 mol.L^{-1} ; A_3 , água deionizada; B, banho de água; P, bomba peristáltica; A, amostra; ER, reator enzimático; M, cela de difusão; V, válvula introdutora de amostra; C, cela de condutimétrica; R, registrador.

Uma coluna de resina iônica trocadora pode ser inserida ao sistema em (A_3) que conduz a água deionizada, com a finalidade de eliminação de espécies iônicas absorvidas durante o tempo de exposição da água deionizada ao ar. O volume de amostra introduzido foi fixado em 100 μL.

A cela de difusão[99,105,106] utilizada emprega uma fita de PTFE comercial como membrana.

Foi utilizada uma cela condutimétrica similar à descrita por Tubino[100] de volume cerca de 42mL e constante de 20 a 25 cm^{-1}. A válvula de injeção de amostra, construída em laboratório, foi descrita previamente por Tubino e Barros[103].

IV.5.2 Determinação de Paraoxon pelo Método Condutimétrico:

O método utiliza o mesmo sistema FIA do método anterior, onde o ácido acético formado pelo produto da reação enzimática é monitorado por condutimetria. Porém, na presença de pesticida, a enzima é inibida e desta forma ocorre um decréscimo do produto da reação enzimática. Posteriormente a enzima inibida é reativada com TMB-4[9-10].

Para a análise de uma determinada concentração de pesticida, primeiramente injeta-se uma solução de acetilcolina de concentração conhecida, a qual passa pela coluna enzimática, onde é gerado o ácido

acético que é monitorado por condutimetria. Posteriormente, uma solução padrão de paraoxon, também de concentração conhecida é injetada, passa pelo reator enzimático e a enzima é inibida. Novamente nova solução de acetilcolina é injetada gerando uma quantidade menor de ácido acético em relação à anterior; pois parte enzima não se encontra mais livre para reagir com a solução, e um sinal menor é monitorado. A diferença de sinal antes e depois da inibição enzimática é diretamente proporcional á concentração do pesticida. A reativação da enzima é conseguida pela injeção da solução de TMB-4. Desta forma o sistema está pronto para uma nova análise.

IV.5.3 Determinação de Acetilcolina pelo Método Espectrofotométrico:

A determinação de acetilcolina pelo método espectrofotométrico utiliza o mesmo sistema FIA empregado no método anterior por condutimetria. Entretanto, foi efetuada uma modificação do sistema condutimétrico para o sistema espectrofotométrico onde o fluxo de água deionizada é substituído por um indicador ácido-base (PBC).

Neste método a determinação de acetilcolina também baseou-se na formação de ácido acético gerado pela reação da mesma com a enzima acetilcolinesterase. O ácido acético permeado pela membrana de PTFE é detectado pela mudança de coloração do indicador ácido base (PBC), a qual é monitorada por um espectrofotômetro. Este indicador apresenta uma

coloração púrpura em pH acima de 7,0, e amarela em meio ácido. Um diagrama esquemático para determinação de acetilcolina é representado na Figura IV.3.

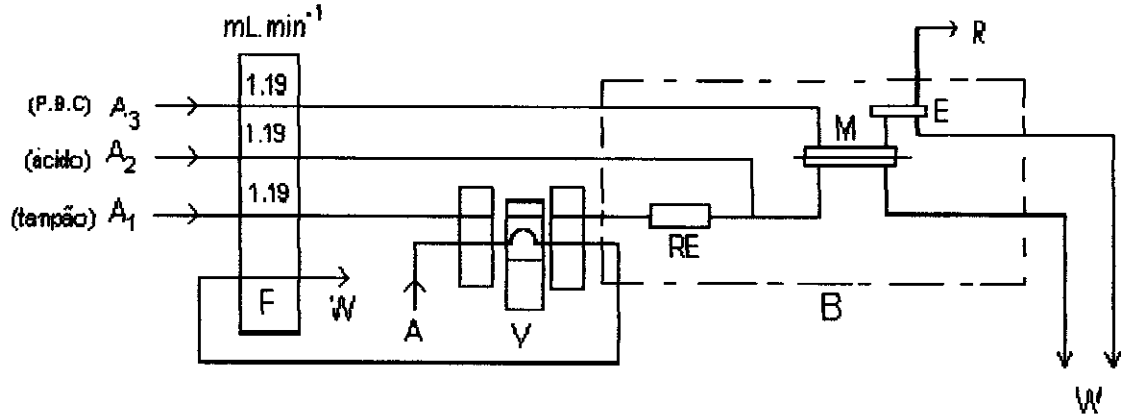


Figura IV.3. A_1, fluxo de tampão fosfato 0,1 mol.L^{-1}; A_2, solução de ácido sulfúrico amostra; A_3, solução de púrpura de bromo cresol pH=7,0; A, amostra; ER, reator enzimático; M, cela de difusão; V, válvula introdutora de amostra; E, espectrofotômetro; R, registrador. (comprimento de onda = 400nm)

Semelhante ao sistema anterior, a amostra de acetilcolina (A) combina com tampão fosfato (A_1) e passa através de um reator enzimático (RE). Após passar no reator enzimático, a solução combina com ácido sulfúrico (A_2) e passa por uma cela de difusão; então o ácido acético formado difunde através de uma membrana de PTFE e é conduzido por um fluxo do indicador PBC (A_3) para um espectrofotômetro (E) acoplada à um registrador potenciométrico(R) onde o sinal é registrado.

IV.5.4 Determinação de Pesticida pelo Método Espectrofotométrico:

O sistema FIA para determinação de pesticidas pelo método espectrofotométrico foi o mesmo utilizado para a determinação de acetilcolina, onde o ácido acético formado pelo produto da reação enzimática é monitorado espectrofotometricamente. Novamente, na presença de pesticida, a enzima é inibida e desta forma ocorre um decréscimo do produto da reação enzimática. Posteriormente a enzima inibida irreversivelmente é reativada com TMB-4, e a mesma coluna enzimática pode ser reutilizada.

Capítulo V

Determinação de Acetilcolina Pelo Método Condutimétrico.

V.1 - Precisão do Método.
V.2 - Exatidão do Método.
V.3 - Durabilidade da Coluna.
V.4 - Efeito da Variação das Condições do Sistema FIA.
V.5 - Tempo de Análise do Método.
V.6 - Comparação entre os dois Métodos de Imobilizaçãp.

V. DETERMINAÇÃO DE ACETILCOLINA POR CONDUTIMETRIA

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O método de determinação de acetilcolina é baseado na reação da mesma com a enzima acetilcolinesterase imobilizada em "glass beads", em meio tampão fosfato (pH = 8,0), com formação de ácido acético. A solução é acidificada com H_2SO_4 diluído (0,1 $mol.L^{-1}$). O ácido acético posteriormente é permeado através de uma membrana de PTFE, recebido por um fluxo de água deionizada, e determinado condutimetricamente.

O mecanismo catalítico da colinesterase que já foi apresentado anteriormente (capítulo I), deve ser processado em meio tamponado (pH = 8,0), pois é o pH em que a enzima possui sua maior atividade. Entretanto, é necessário diminuir o pH do meio contendo o produto da reação, para permitir que todo ácido acético formado esteja na forma não ionizada e não na forma de acetato. Neste caso, a confluência que mistura o tampão fosfato contendo o ácido acético formado com o ácido sulfúrico, é colocada após a coluna enzimática, de forma que o ácido não passe pelo reator, pois causaria a imediata denaturação da enzima.

Um fiagrama representativo da determinação de acetilcolina pelo método FIA descrito é apresentado na Figura V.1. A curva foi obtida com medidas em triplicata de padrões de acetilcolina na faixa de 10^{-5} a 10^{-3} $mol.L^{-1}$.

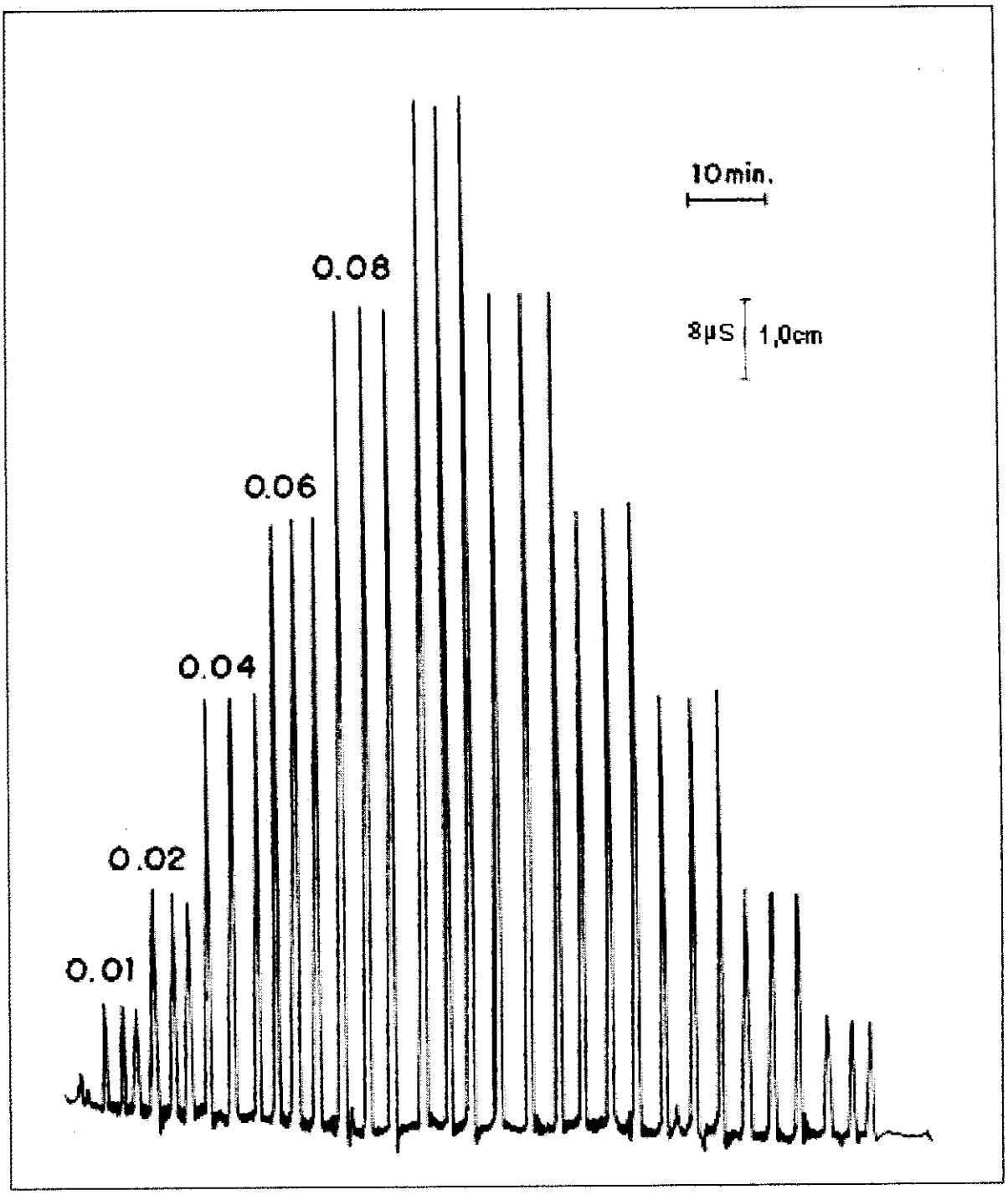


Figura V.1 - Curva de calibração de injeção em fluxo para acetilcolina. Da esquerda para a direita esquerda: sinais em triplicata de padrões de acetilcolina (0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 $mmol.L^{-1}$) e os menos padrões na ordem reversa. Alça de amostragem de polietileno com volume de 100 μL (1,0mm d.i.).

V.1 PRECISÃO DO MÉTODO:

A Figura V.2 mostra uma curva de calibração incluindo pontos cobrindo a concentração na faixa de 10^{-5} a 10^{-3} mol.L^{-1} de acetilcolina. Para a construção da curva de calibração foram utilizados triplicatas de padrões de acetilcolina de concentrações 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,20; 0,40; 0,80; 1,00 mmol.L^{-1}.

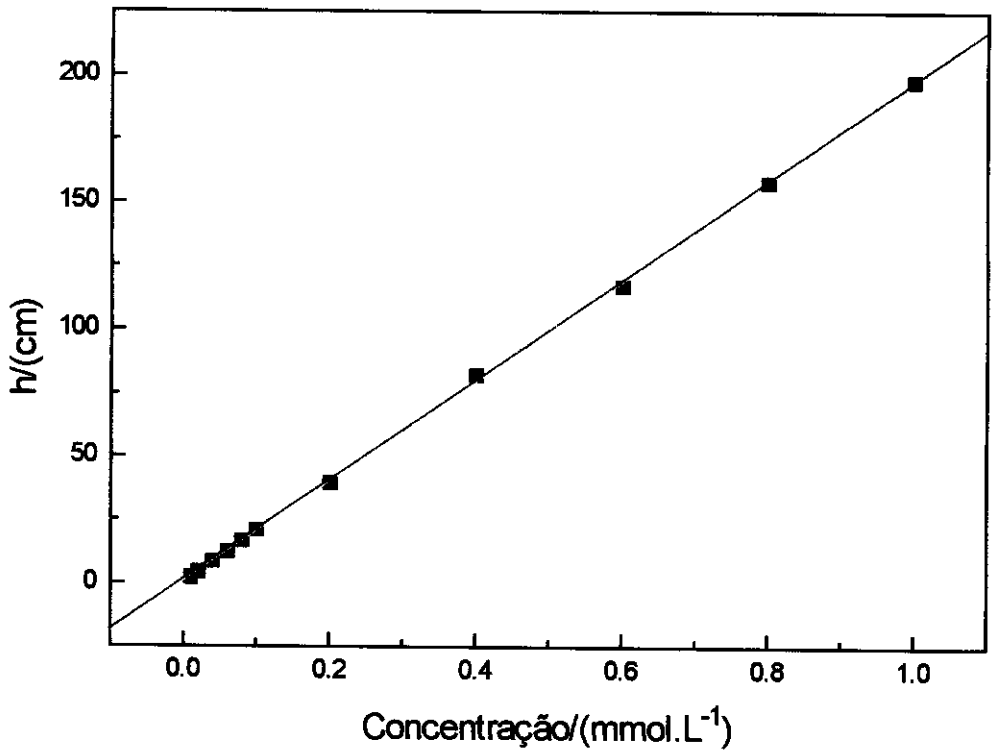


Figura V.2 - Curva de calibração para determinação de acetilcolina, cobrindo a concentração na faixa de 10^{-5} a 10^{-3} mol.L^{-1}.

A curva de calibração obedece à seguinte equação: **h** = 1,9696x10^5 **C** + 0,707 e apresenta coeficiente de correlação de 0,9998. Nesta equação, **h** é a altura de pico em centímetros e **C** é a concentração da acetilcolina em mol.L^{-1}. O método apresenta desvio padrão relativo de 1,8% para soluções de acetilcolina 1x10^{-3} mol.L^{-1} (n=14). Os resultados obtidos pela da curva de calibração presentam uma precisão satisfatória nestas faixas de concentração.

V.2 EXATIDÃO DO MÉTODO:

A aplicação do método em amostras reais foi testada utilizando o método da adição de padrão. Utilizou-se um preparado oftálmico farmacêutico comercial (solução estoque) usado em operações cirúrgicas dos olhos, contendo 28,6% de acetilcolina liofilizada e 71,4% de manitol (1,0 mol.L^{-1}). As soluções padrão de acetilcolina foram preparadas diariamente a partir da diluição da solução estoque, em tampão fosfato.

Os resultados obtidos, apresentados na Tabela V.1, mostram uma boa exatidão do método com erro máximo de 7,8%. Todas as medidas foram feitas em triplicata e a média de cada valor obtido foi registrado na tabela. A estimativa do desvio padrão médio, nos valores das alturas, é de ±0,08, e o desvio padrão relativo (n=3) foi de 2,1% para uma concentração de 9,0 x 10^{-6} mol.L^{-1} de acetilcolina adicionada.

TABELA V.1

Teste de Recuperação, pelo Método da Adição de Padrão na Determinação de Acetilcolina em Formulação Oftálmica.

Concentração da solução de acetilcolina preparada/(mol.L^{-1})	Concentração da solução de acetilcolina adicionada /(mol.L^{-1})	Total de acetilcolina encontrada /(mol.L^{-1})	acetilcolina encontrada na amostra /(mol.L^{-1})	% de Recuperação
1,87 x 10^{-5}	9,0 x 10^{-6}	2,84 x 10^{-5}	1,94x10^{-5}	104,0
4,34 x 10^{-5}	1,80 x 10^{-5}	6,14 x 10^{-5}	4,34x10^{-5}	100,0
7,14 x 10^{-5}	3,60 x 10^{-5}	10,80 x 10^{-5}	7,18x10^{-5}	100,6

V.3 DURABILIDADE DA COLUNA:

Uma coluna enzimática pode ser utilizada durante 4 meses sem perder a atividade (aproximadamente 100 vezes), desde que devidamente estocada em geladeira e em tampão fosfato. Após este tempo verificou-se que a atividade da enzima decresce lentamente com o uso. O método proposto apresenta a vantagem de que apenas uma pequena quantidade de enzima é necessária para a imobilização.

V.4 EFEITO DA VARIAÇÃO DE CONDIÇÕES DO SISTEMA FIA:

V.4.1 Variação da concentração do ácido sulfúrico:

Realizou-se as medidas em quadruplicata para cada concentração de acetilcolina $1x10^{-3}$ mol.L^{-1} e ácido sulfúrico nas concentrações 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 mol.L^{-1}. A Tabela V.2 mostra a média aritmética dos valores obtidos para as diferentes concentrações de ácido. Observou-se que a concentração de 1,0 mol.L^{-1} de ácido sulfúrico fornece resultados bons, com altura de pico satisfatória e boa precisão das medidas, com desvio padrão médio igual à aproximadamente de ± 0,01.

TABELA V.2 - Determinação da concentração de acetilcolina em função da variação da concentração do ácido sulfúrico.

Concentração do Ácido Sulfúrico (mol.L^{-1})	*Altura do Pico (cm)
0,1	7,40 ± 0,01
0,5	13,90 ± 0,01
1,0	14,33 ± 0,01
2,0	14,13 ± 0,01

* média de 4 determinações.

V.4.2 Variação da Vazão:

Foi feito o estudo da variação da vazão da seguinte forma: adotou-se uma concentração de acetilcolina (1 X 10^{-4} mol.L^{-1}), e manteve-se as mesmas condições para todas as medidas, com exceção obviamente da vazão (Tabela V.3). Observou-se que a altura do pico varia sensivelmente quando se compara os resultados obtidos para vazão de 1,19 mL.min^{-1} com as vazões maiores. Vazões grandes não permitem uma hidrólise completa da acetilcolina, uma vez que o tempo de contato entre a enzima e o substrato é um fator importante para que ocorra a reação. Outro fator é que fluxos grandes não permitem que todo ácido acético formado permeie pela membrana.

A estimativa do desvio padrão médio, nos valores das alturas, é de ± 0,06. Foram feitas quatro medidas para cada vazão diferente.

TABELA V.3

Determinação da concentração de acetilcolina em função da vazão.

Vazão (ml.min^{-1})	Altura do pico (cm)
1,19	14,50
1,70	6,75
2,19	4,90
2,79	4,70
3,39	4,65

* média de 4 determinações

V.5 TAXA DE AMOSTRAGEM DO MÉTODO:

O método possui uma taxa de amostragem de cerca de 20 determinação por hora.

V.6 COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO:

Foram feitos estudos comparativos com os dois tipos diferentes de imobilização. Primeiramente a enzima foi imobilizada em "CPG" (método adotado) e para efeito de comparação a enzima foi imobilizada em sílica gel modificada.

Para este tópico, utilizou-se o mesmo sistema FIA usado anteriormente, com a diferença que o reator enzimático foi substituído por outro onde a colinesterase permaneceu imobilizada em sílica gel e não em "CPG". As soluções de acetilcolina estudadas neste sistema também apresentou a mesma faixa de concentração estudada no item anterior. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a imobilização em sílica gel modificada também apresentou resultados favoráveis.

V.6.1 Tempo de Vida do Reator Enzimático:

A mesma coluna enzimática pode ser utilizada cerca de 60 vezes, desde que devidamente estocada após o uso em tampão fosfato e em geladeira a 4°C. Embora esta durabilidade seja razoável, comparando os dois métodos de imobilização ("CPG" e sílica gel), conclui-se que o tempo de vida do reator

enzimático com imobilização em sílica gel é quase 2 vezes menor que o tempo de vida do reator enzimático com imobilização em "CPG".

V.6.2 Sensibilidade e Reprodutibilidade Do Método:

O método apresenta uma faixa linear de concentração entre $1,0\times10^{-4}$ a $1,0\times10^{-3}$ mol.L^{-1} de acetilcolina (Figura V.3).

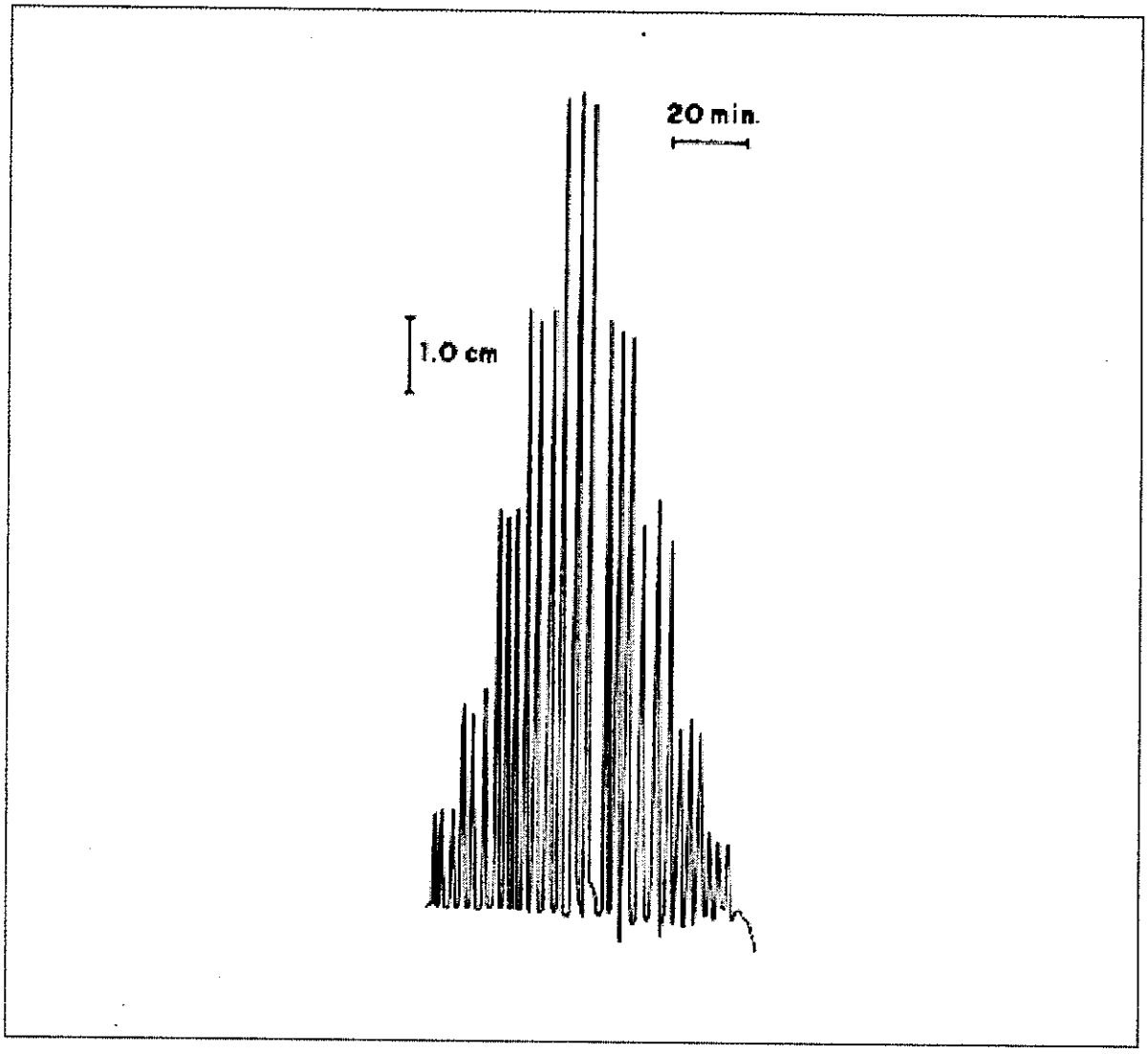


Figura V.3 - a) Curva de calibração de injeção em fluxo para acetilcolina utilizando imobilização em sílica gel modificada. Da esquerda para a direita: sinais em triplicata de padrões de acetilcolina (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mmol.L^{-1}) e os mesmos padrões na ordem reversa. Alça de amostragem de polietileno com volume de 100μL.

A Figura V.3 mostra um fiagrama (concentração (mmol.L^{-1}) × altura de pico(cm)) cobrindo esta faixa de concentração de soluções de acetilcolina. Para a construção da curva de calibração foram feitas triplicatas de padrões de acetilcolina de concentrações: 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 mmol.L^{-1}.

A Figura V.4 mostra uma curva de calibração (concentração (mmol.L^{-1}) × altura de pico(cm)), que é uma representação gráfica do resultado obtido pela Figura V.3.

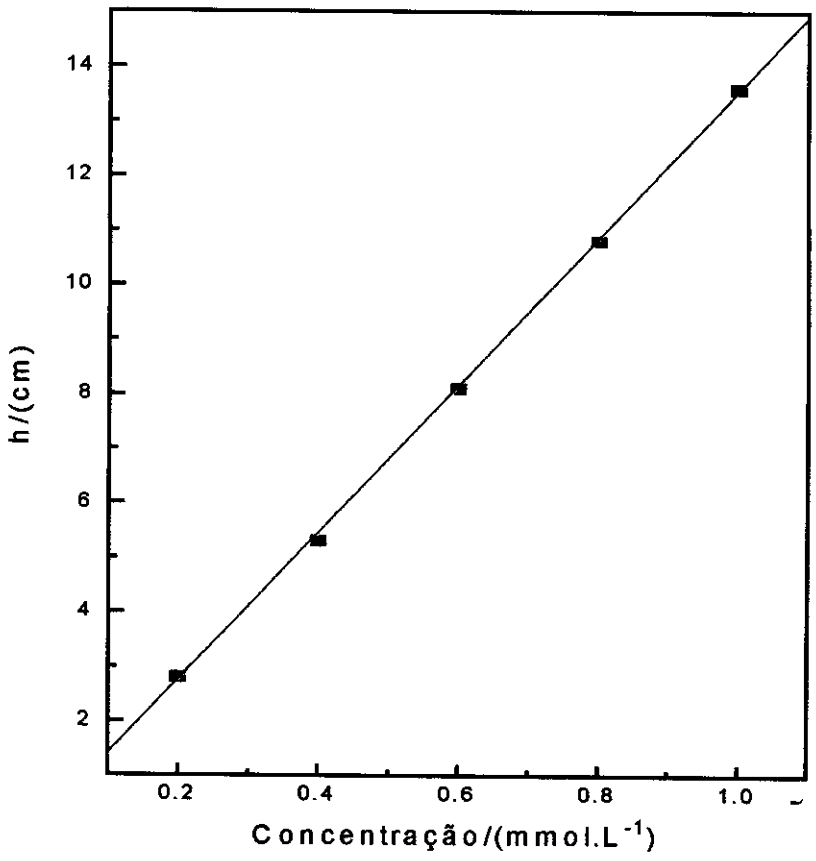


Figura V.4 - Curva de calibração para determinação de acetilcolina (imobilização da enzima em sílica gel modificada). Altura do pico em centímetros e a concentração em mmol.L^{-1}.

A Figura V.4 obedece a seguinte equação: h = 1,355 - 0.01**C** com coeficiente de correlação de 0,9998 (n=3). Nesta equação, a altura do pico (h) está representada em centímetros e a concentração em mmol.L^{-1}.

O método apresenta desvio padrão relativo de 4,0% para uma solução $1,0\times10^{-3}$ mol.L^{-1} de acetilcolina (n=14).

Comparando as curvas de calibração da página 58 e esta (pág. 65), observa-se que apesar de apresentarem uma faixa de linearidade semelhante, a perda de sensibilidade usando a sílica gel é bastante acentuada.

Como as colunas foram preparadas de modo semelhante, esta perda de sensibilidade poderia ser explicada pela influência do processo de preparação da coluna de sílica gel modificada.

V.6.3 Taxa de amostragem do Método:

O método apresenta uma taxa de amostragem do método de aproximadamente 20 determinações por hora. Comparando com o método anterior, verifica-se o mesmo tempo de análise, o que é facilmente justificado, uma vez que o sistema FIA utilizado é o mesmo, embora o reator enzimático possui algumas características diferentes. Entretanto procurou-se tomar o cuidado de construir reatores de mesmo volume (comprimento e largura iguais), sendo o tamanho do "CPG" próximo ao tamanho das partículas de sílica gel utilizada.

Capítulo VI

Determinação de Acetilcolina Pelo Método Espectrofotométrico

VI.1 - Precisão do Método.

VI.2 - Exatidão do Método.

VI.3 - Efeito da Variação de Condições do Sistema FIA.

VI.4 - Tempo de Análise do Método.

VI. DETERMINAÇÃO DE ACETILCOLINA PELO MÉTODO ESPECTOFOTOMÉTRICO

Neste método a determinação de acetilcolina também baseou-se na formação de ácido acético pela reação da acetilcolina com a enzima acetilcolinesterase. A formação deste ácido é monitorada, após permeação por membrana, onde é recebido por um fluxo de púrpura de bromocresol (PBC) e é quantificado espectrofotometricamente (540 nm) pela mudança de cor do indicador ácido-base (de violeta para amarelo), o qual, possui uma faixa de viragem em pH próximo de 7,0.

Verificou-se que a concentração de acetilcolina é proporcional à concentração do ácido acético formado, que por sua vez é proporcional à altura de pico (cm) registrada.

VI.1 PRECISÃO DO MÉTODO:

Um fiagrama representativo da determinação de acetilcolina pelo método FIA com determinação espectrofotométrica é apresentado na Figura VI.1. As determinações foram obtidas com medidas em triplicata de padrões de acetilcolina na faixa de $1,0x10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ $mol.L^{-1}$. A curva de calibração (Figura VI.2) obedece a seguinte equação: $\mathbf{h} = 0,17294\ \mathbf{C} + 0,32547$ e apresenta coeficiente de correlação de 0,9998. Nesta equação, h representa a altura de pico em centímetros e **C** a concentração da acetilcolina em $mol.L^{-1}$.

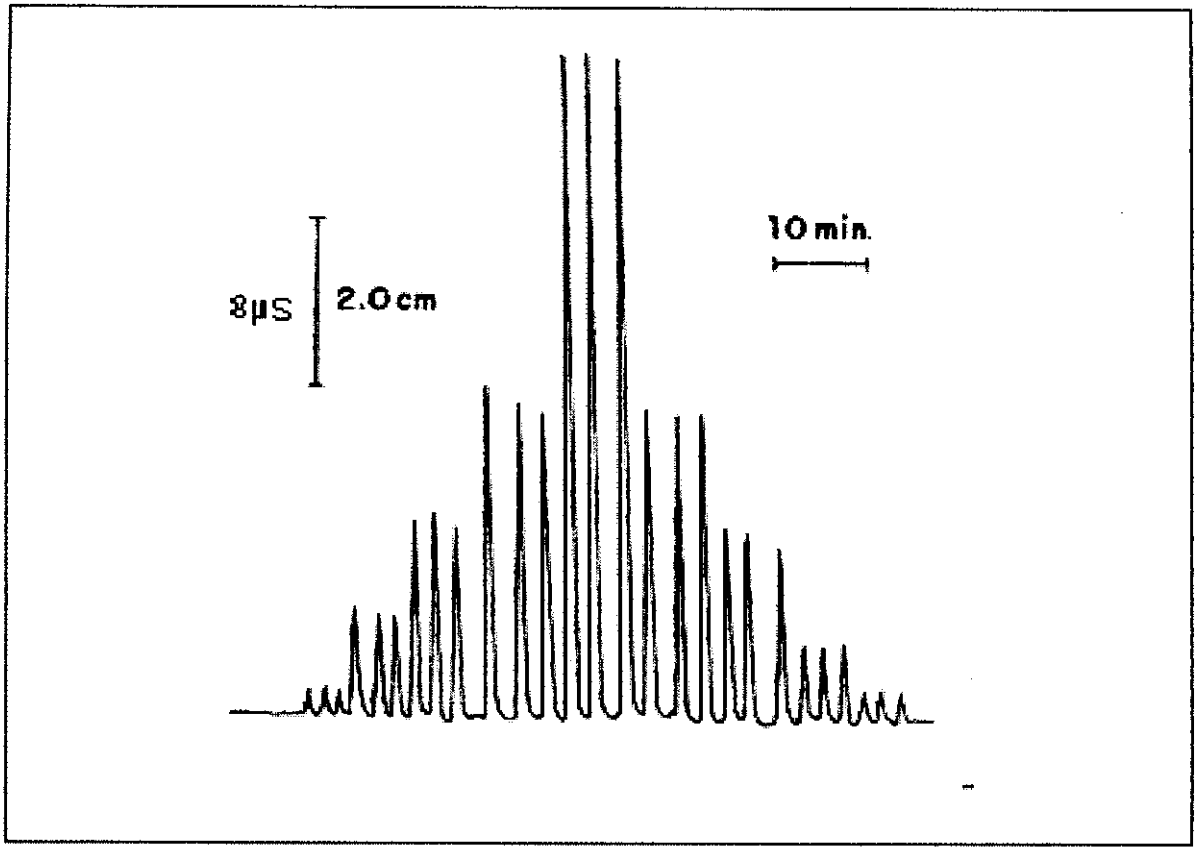


Figura VI.1- Fiagrama de calibração de injeção em fluxo para acetilcolina. Da esquerda para a direita: sinais em triplicata de padrões de acetilcolina (0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 mmol.L^{-1}) e os padrões na ordem reversa.

A precisão do método foi estuda em uma faixa de concentração de $1{,}0\times10^{-4}$ mol.L^{-1} a $5{,}0\times10^{-3}$. Os resultados obtidos mostram que o método possui boa precisão nesta faixa de concentração. Entretanto para concentrações superiores, o método apresenta desvio de linearidade, devido a saturação da coluna enzimática.

VI.2 EXATIDÃO DO MÉTODO:

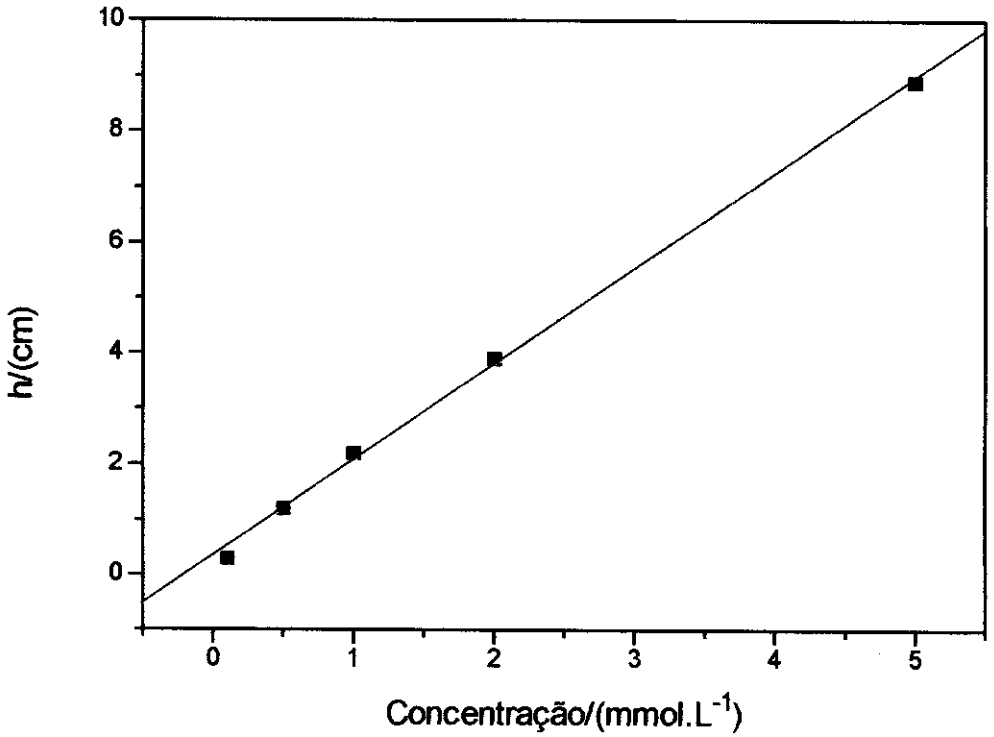


Figura VI.2 - Curva de calibração para determinação de acetilcolina. h = altura do pico(cm); Concentração de acetilcolina (mmol.L^{-1}). Alça de amostragem de polietileno com volume de 100 μL (1,0mm d.i.).

Aplicação do método em amostras reais também foi verificada por teste de recuperação utilizando o método da adição de padrão. Semelhante ao método condutimétrico, utilizou-se uma fórmulação oftálmica farmacêutica comercial, usada em operações cirúrgicas dos olhos, contendo 30,2% de acetilcolina liofilizada e 69,8% de manitol.

Os resultados obtidos, apresentados na Tabela VI.1, mostram uma boa concordância com os valores declarados pelo fabricante, com erro máximo de 6,2%.

TABELA VI.1 - Teste de recuperação, pelo método de adição padrão na determinação de acetilcolina:

Concentração da solução de acetilcolina preparada (mol.L^{-1})	Concentração da solução de acetilcolina preparada (mol.L^{-1})	Total de acetilcolina encontrada (mol.L^{-1})	acetilcolina encontrada na amostra (mol.L^{-1})	% de Recuperação
$1,0 \times 10^{-3}$	$9,0 \times 10^{-4}$	$2,02 \times 10^{-3}$	$1,12 \times 10^{-3}$	106,2
$1,0 \times 10^{-3}$	$1,80 \times 10^{-3}$	$2,70 \times 10^{-3}$	$9,0 \times 10^{-4}$	103,6
$1,0 \times 10^{-3}$	$2,70 \times 10^{-3}$	$3,62 \times 10^{-3}$	$9,2 \times 10^{-4}$	102,7
$1,0 \times 10^{-3}$	$3,60 \times 10^{-3}$	$4,33 \times 10^{-3}$	$9,5 \times 10^{-4}$	105,8

Comparando o método espectrofotométrico de determinação da acetilcolina com o método condutimétrico, verifica-se que o método espectrofotométrico mostrou ser menos sensível que o condutimétrico. Entretanto ambos os métodos possuem precisão e exatidão adequadas.

VI.3 EFEITO DA VARIAÇÃO DE CONDIÇÕES DO SISTEMA FIA:

VI.3.1 Variação da concentração do ácido sulfúrico:

Realizou-se as medidas em quadruplicata para a concentração de acetilcolina $5,0 \times 10^{-3}$ mol.L^{-1} e ácido sulfúrico nas concentrações 0,1;0,5; 1,0 ;2,0 mol.L^{-1}. A Tabela VI.2 mostra a média aritmética dos valores obtidos das alturas dos picos para as diferentes concentrações de ácido. Todas as medidas foram feitas em quadruplicata.

TABELA VI.2

Determinação da Concentração de Acetilcolina em Função da Variação da Concentração do Ácido Sulfúrico.

Conc. do Ácido Sulfúrico/(mol.L^{-1})	*Altura do Pico/(cm)
0,1	4,30 ± 0,02
0,5	7,50 ± 0,02
1,0	8,00 ± 0,08
2,0	7,80 ± 0,02

*média de 4 determinações.

Os dados obtidos na Figura VI.2 são apresentados na Tabela VI.2. Observa-se que altura do pico aumenta com o aumento da concentração de ácido sulfúrico à uma determinada concentração de acetilcolina. A solução do substrato utilizada foi de 5,0x10^{-3} mol.L^{-1}.

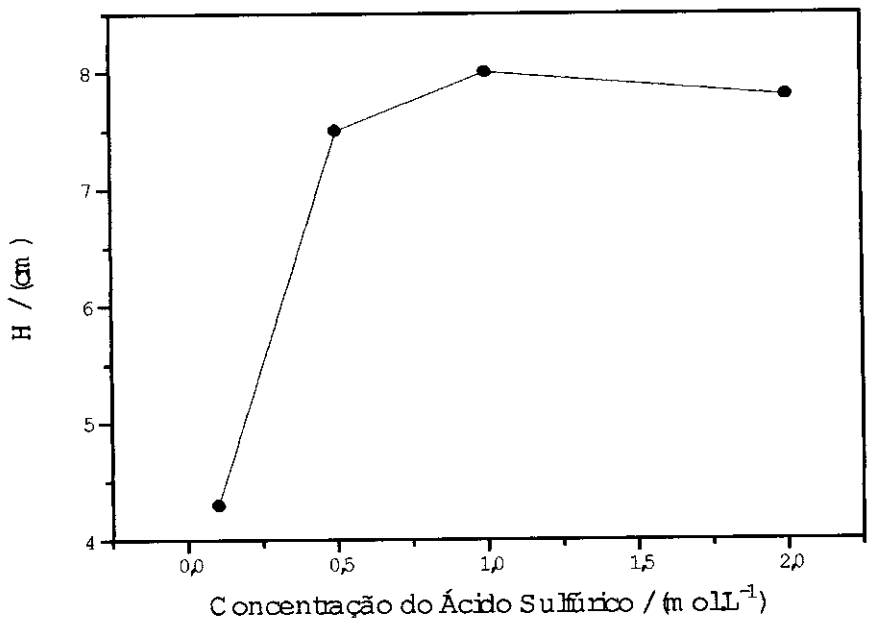


Figura VI.2 - Efeito da concentração do ácido sulfúrico na altura de pico. h = altura do pico(cm); Concentração do ácido sulfúrico ($mol.L^{-1}$), Concentração de acetilcolina $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$. Alça de amostragem de polietileno com volume de 100µL (1,0mm d.i.).

VI.3.2 Variação da Vazão:

Foi feito o estudo da variação da vazão da seguinte forma: utilizou-se uma solução de acetilcolina $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$, e manteve-se as mesmas condições para todas as medidas da Tabela VI.3.

Foram feitas quatro medidas para cada vazão diferente. Adotou-se a vazão de 1,19$ml.L^{-1}$ por mostrar maior sinal e por permitir uma freqüência analítica adequada.

TABELA VI.3

Determinação da concentração de acetilcolina em função da vazão.

Velocidade de Fluxo: (FR): $Fr_{A1} = Fr_{A2} = Fr_{A3} = 1,19$ mL.min^{-1}.

Vazão (mL.min^{-1})	*Altura do pico (cm)
1,19	8,50 ± 0,22
1,70	4,00 ± 0,05
2,19	2,90 ± 0,11
2,79	2,70 ± 0,06
3,39	2,00 ± 0,05

*média de 4 determinações

Observou-se que a altura do pico varia sensivelmente quando se comparam os resultados obtidos para vazão de 1,19 mL.min^{-1} com vazões mais rápidas. Vazões muito rápidas não permitem uma hidrólise completa da acetilcolina, e possuem menor tempo de permeação do ácido acético, assim o sinal diminui a medida que aumenta o fluxo.

A representação gráfica dos dados obtidos, na Tabela VI.3, da altura de pico (h/cm) versus a velocidade de fluxo (mL.min^{-1}), são mostrados na Figura V.3, e pode ser representada pela seguinte equação: **h** = 2,266 + 5,14e^(-(**F** -1,269)/ 0,416) e desvio padrão de ±0,2.

Os dados obtidos mostram que ocorre uma diminuição da altura do pico, com o aumento da vazão. Isto pode ser explicado por dois fatores. Da mesma

forma que no método anterior, um aumento na velocidade de fluxo, diminui o tempo de contato entre o substrato e a enzima e portanto diminui a quantidade do produto de reação, que é o ácido acético. Outro fator é devido ao tempo de permeação. Em tempos menores espera-se que menos ácido acético permeie através da membrana.

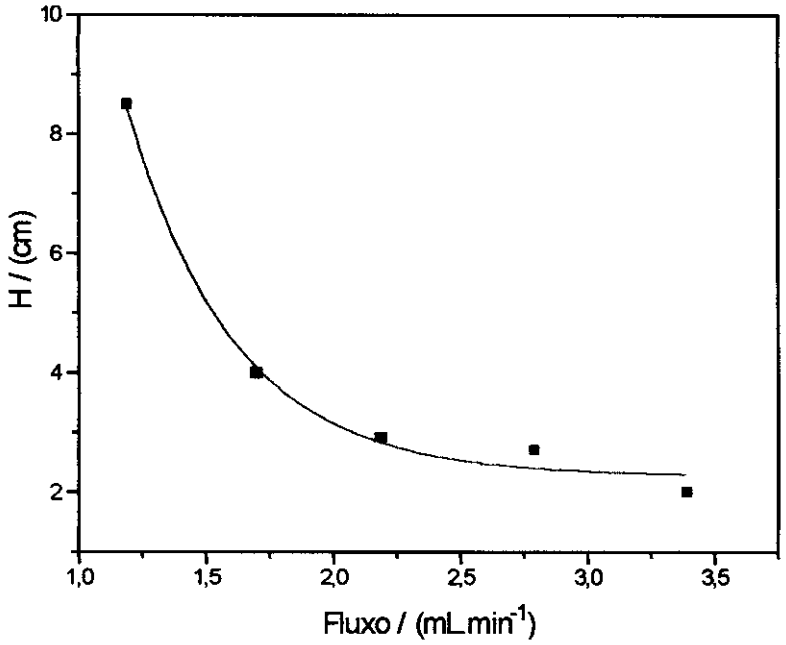


Figura V.3 - Efeito da variação do fluxo na altura de pico. h = altura do pico(cm); Fluxo ($mL.min^{-1}$). Alça de amostragem de polietileno com volume de 100μL (1,0mm d.i.).

VI.4 TEMPO DE ANÁLISE DO MÉTODO:

O método possui uma taxa de amostragem de cerca de 20 análises por hora. A durabilidade da enzima corresponde à aproximadamente 100 determinações.

Capítulo VII

Determinação de Paraoxon pelo Método Condutimétrico

VII.1 - Precisão e Sensibilidade do Método.

VII.2 - Durabilidade da Coluna.

VII.3 - Efeito da Variação das Condições do Sistema FIA.

VII.4 - Número de determinações de Paraoxon.

VII. DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS PELO MÉTODO CONDUTIMÉTRICO:

O sistema FIA para a determinação de paraoxon é o mesmo utilizado para determinação de acetilcolina. O método é baseado na geração de ácido acético pela reação da acetilcolina com a enzima acetilcolinesterase. A inibição da acetilcolinesterase imobilizada ocorre pela introdução de uma concentração conhecida de solução de paraoxon. A reação do pesticida com a enzima causa um decréscimo da atividade enzimática, determinada pelo decréscimo da altura de pico com uma nova injeção da solução de acetilcolina, em função direta de um decréscimo da quantidade de ácido acético formado pela reação da acetilcolinesterase imobilizada com nova solução de acetilcolina. A diferença entre a altura de pico antes e depois da inibição enzimática por paraoxon para uma determinada concentração de acetilcolina, pode ser utilizada para determinação quantitativa de paraoxon.

Para reutilização da coluna enzimática para a próxima determinação quantitativa de paraoxon, a enzima inibida é reativada com solução de TMB-4[9,10].

A reativação da acetilcolinesterase com solução de TMB-4 ($5{,}0\times10^{-5}$ $mol.L^{-1}$) é rápida e completa dentro das condições experimentais usadas. Entretanto para concentrações de paraoxon maiores do que 1×10^{-5} $mol.L^{-1}$, é necessário utilizar soluções mais concentradas de TMB-4.

A Figura VII.1 mostra um fiagrama da inibição enzimática do paraoxon e a regeneração da atividade enzimática.

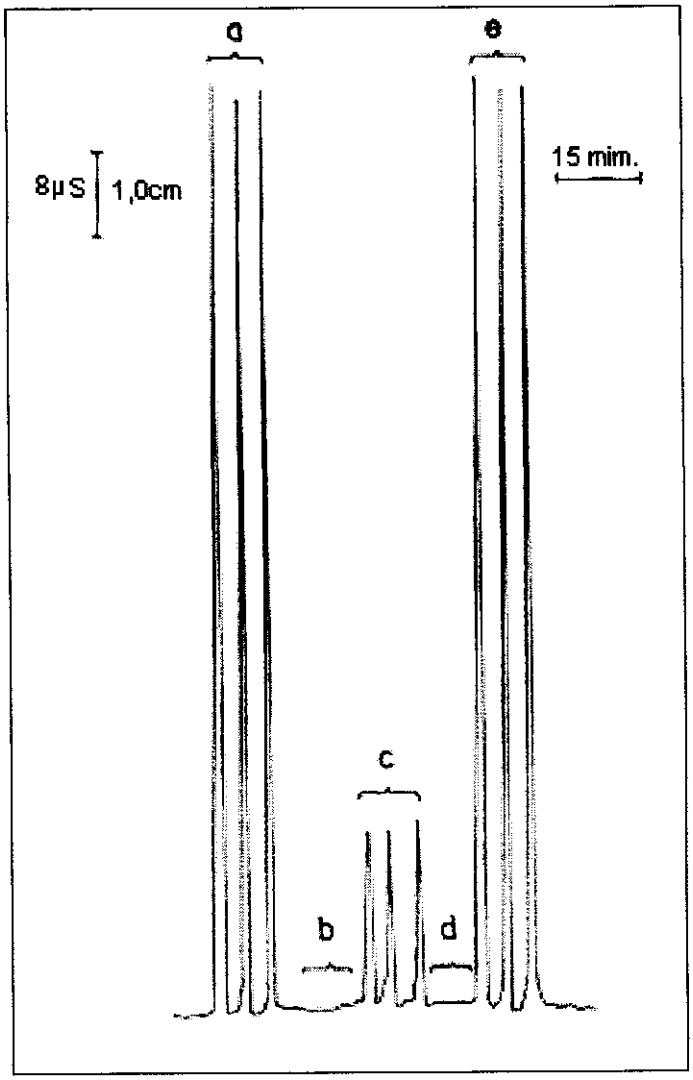


Figura VII.1 - Efeito da inibição da acetilcolinesterase pelo paraoxon e posterior reativação da enzima com TMB-4. Da esquerda para a direita: (a) sinais em triplicata de solução padrão de acetilcolina $1,0x10^{-3}$ mol.L^{-1}; (b) introdução de $5,0x10^{-6}$ mol.L^{-1} de solução de paraoxon (uma introdução); (c) sinais em triplicata de solução $1,0x10^{-5}$ mol.L^{-1} de acetilcolina após a inibição da acetilcolinesterase; (d) introdução de $5,0x10^{-5}$ mol.L^{-1} de solução de TMB-4 (uma introdução); (e) sinais em triplicata para solução $1,0x10^{-3}$ mol.L^{-1} de acetilcolina, após a reativação da enzima com solução de TMB-4 $5,0x10^{-5}$ mol.L^{-1}. Alça de amostragem de polietileno com volume de 100 μL(1,0mm d.i.). Condutância: 1,0 cm = 8,0 μS. A curva é representada por sinal (cm) × tempo (min).

Na Figura VII.1 a região **a** corresponde a sinais em triplicata de soluções de $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L^{-1} de acetilcolina. A região **b**, onde nenhum sinal é observado, representa a introdução de $5,0 \times 10^{-6}$ mol.L^{-1} de solução de paraoxon,. A região **c** mostra os picos obtidos com solução de $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L^{-1} de acetilcolina após a inibição da coluna enzimática com solução de paraoxon. A região **d** corresponde à introdução de solução de $5,0 \times 10^{-5}$ mol.L^{-1} de TMB-4. Na região **e** são mostrados sinais, em triplicatas, de solução de acetilcolina $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L^{-1}, obtidos após a regeneração da enzima. Pode-se observar facilmente que a reativação da enzima é rápida e completa, nestas faixas de concentração de pesticida, enzima e regenerador.

VII.1 PRECISÃO E SENSIBILIDADE:

Testes de inibição foram conduzidos utilizando diferentes concentrações de pesticida e sucessivas recuperações da atividade da enzima. O método apresenta relação linear entre condutividade e concentração de pesticida na faixa de $1,0\times10^{-5}$ mol.L^{-1} to $1,0\times10^{-7}$ mol.L^{-1} (Figura VII.2). A curva segue a equação $\mathbf{h'} = 1.124\text{x}10^{6}\,\mathbf{C} + 1.661$ com coeficiente de correlação 0.9987. **h'** representa a diferença entre a altura de pico (cm) antes e depois da inibição da enzima pelo pesticida. **C** representa a concentração de paraoxon (mol.L^{-1}). Como é observado na Figura VII.1, a recuperação da atividade da coluna enzimática é facilmente efetuada com

solução de $5{,}0\times10^{-5}$ mol.L^{-1} de TMB-4. Entretanto para maiores concentrações de paraoxon, são necessárias maiores concentrações de TMB-4.

O método apresenta desvio padrão relativo de 2,2% (n=8) para uma solução $1{,}0\times10^{-3}$ mol.L^{-1} de acetilcolina com uma solução de $5{,}0\times10^{-6}$ mol.L^{-1} de paraoxon.

O limite quantitativo de detecção pode ser considerado cerca de $1{,}0 \times 10^{-7}$ mol.L^{-1} de paraoxon. Entretanto, numa análise semi-quantitativa, pode-se detectar até $1{,}0\text{x}10^{-8}$ mol. L^{-1}.

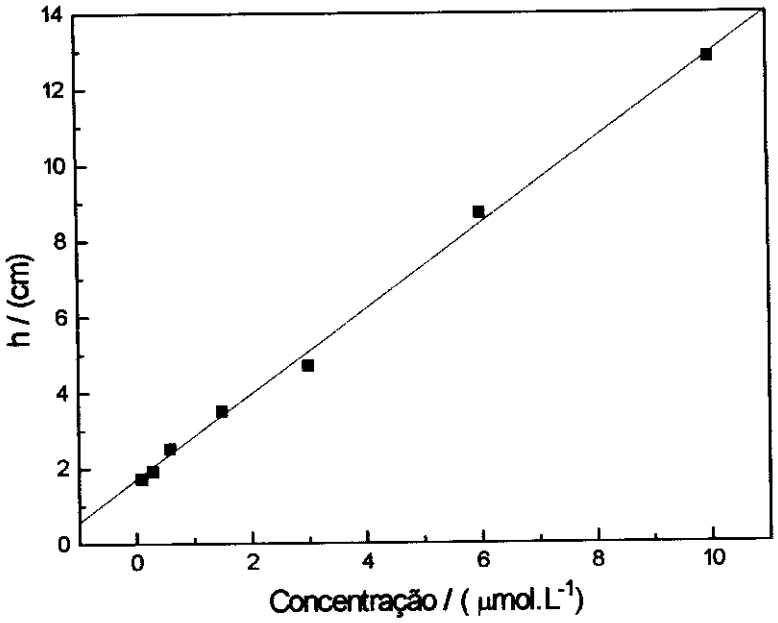


Figura VII.2 - Curva calibração para o paraoxon na faixa de $1{,}0\text{x}10^{-5}$ mol.L^{-1} a $1{,}0\text{x}10^{-7}$ mol.L^{-1} descrita pela equação **h'** = $1{,}124\text{x}10^{6}$ **C** + 1,661 com uma correlação de 0,9987. Para a equação, **h'** = diferença entre a altura de pico (cm) antes e depois da inibição enzimática pelo pesticida e **C** = concentração de paraoxon (mol.L^{-1}). A reativação da acetilcolinesterase foi feita com uma solução $5{,}0\text{x}10^{-5}$ mol.L^{-1} de TMB-4. Alça de amostragem de Polietileno com volume de 100 μL (1,0mm i.d.) em todos os casos.

VII.2 DURABILIDADE DA COLUNA:

O método permite a reutilização do mesmo reator enzimático por mais de 100 determinações para soluções de paraoxon na faixa de concentrações de $1.0x10^{-5}$ a $1.0x10^{-7}$ $mol.L^{-1}$ sem perda significativa da atividade enzimática, desde que recuperada com solução de TMB-4 e devidamente estocada em meio tampão fosfato e em geladeira após a utilização.

VII.3 EFEITO DA VARIAÇÃO DE CONDIÇÕES DO SISTEMA FIA:

Para otimizar o método, foram estudados alguns parâmetros analíticos importantes, tais como: vazão, temperatura do reator enzimático, volume de amostra e concentração do substrato.

VII.3.1 Variação do Fluxo:

Foram realizadas medidas de determinação de pesticida variando a vazão do sistema. Observou-se que as respostas alteram sensivelmente de acordo com a vazão. A vazão deve ser suficiente lenta para permitir a interação da enzima com o substrato (hidrólise da acetilcolina) e com o pesticida (inibição da acetilcolinesterase). (Figura VII.3, Tabela VII.1).

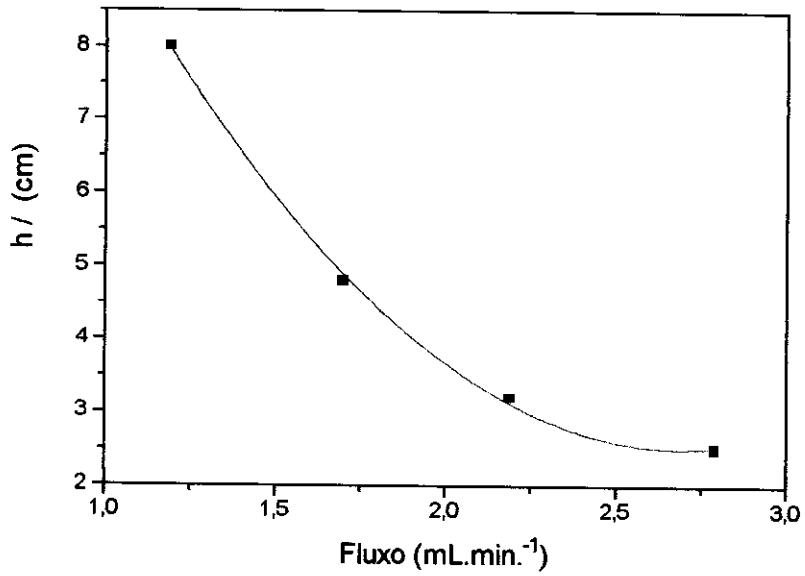


Figura VII.3 - Efeito da variação da velocidade de fluxo na determinação do paraoxon. Solução de acetilcolina $1,0\times10^{-3}$ mol.L^{-1}. Solução de paraoxon $5,0\times10^{-6}$ mol.L^{-1}

A curva pode ser representada pela equação **h'** = 20,043 - 13,021**V** + 2,416**V**^{2} (desvio padrão de r = 0,99953, r^2 =0,99907), e apresenta coeficiente de correlação de 0,12927 . Na equação **h'** representa a diferença entre a altura de pico (cm) antes e depois da inibição da enzima pelo pesticida, e **V** representa a velocidade de fluxo (mL.min^{-1}).

A Tabela VII.1 mostra o efeito da variação da velocidade de fluxo (FR_{A1} = FR_{A2} = FR_{A3}) sobre a altura de pico e sobre a diferença da altura antes e depois da inibição enzimática com o paraoxon. Para cada medida foram feitas quatro determinações apresentando desvio padrão médio entre os pontos de (± 0,08).

TABELA VII.1

Efeito da velocidade de fluxo (FR) ($FR_{A1} = FR_{A2} = FR_{A3}$) na determinação do paraoxon (solução $5,0x10^{-6}$ mol.L^{-1}). Temperatura = 25°C. 1 cm = 8 μS.

Velocidade de Fluxo/(mL.min^{-1})	Altura (A)*/(cm)	Altura (B)*/(cm)	(A) - (B)*/(cm)
1,19	12,1	4,1	8,0
1,70	7,2	2,7	4,8
2,19	5,9	2,4	3,2
2,79	4,8	2,3	2,5

*Altura(A) : solução de acetilcolina $1x10^{-3}$ mol.L^{-1} antes da inibição da enzima pelo pesticida.
*Altura(B) : solução de acetilcolina $1x10^{-3}$ mol.L^{-1} após a inibição da enzima pelo pesticida.
*(A) - (B) : altura (A) menos altura(B).

Na Tabela VII.1 a altura antes da inibição com paraoxon (A), mostra um grande aumento com o decréscimo da vazão. A altura (B), após inibição com paraoxon, também mostra um aumento com o decréscimo da vazão.

Estes aumentos podem ser atribuídos à duas principais causas. Uma está relacionada com o aumento do tempo de contato entre a acetilcolinesterase e o substrato. A outra causa é o aumento da proporção do ácido acético formado que se difunde através da membrana, uma vez que esta difusão depende do tempo que a solução doadora permanece na cela de permeação.

Na altura (B) o fator de aumento a partir da velocidade de fluxo 2,79 mL min^{-1} [(B) = 2,3 cm] para a vazão de 1,19 mL min^{-1} [(B) = 4,1 cm] é 1,78. Comparativamente o fator de aumento da altura (A) referente as mesmas vazões é 12,1 cm/ 4,8 cm = 2,52. O menor aumento relativo na altura (B) com relação a diminuição da vazão pode ser atribuído ao fato que grande parte dos sítios ativos da enzima estão bloqueados pelo paraoxon. Como conseqüência, o aumento do tempo de residência não deve resultar em muito mais reação , uma vez que os sítios ativos da enzima estão em número maior alcançando a saturação facilmente. No caso da altura (A) o aumento do sinal em função do decréscimo da vazão pode ser facilmente entendido em termos do aumento do desenvolvimento da reação, em função da alta concentração de sítios ativos da enzima em relação à concentração de acetilcolina.

A diferença entre (A) e (B), que é (A-B), conduz a um significante aumento a baixas vazões.

A estimativa do desvio padrão médio, nos valores das alturas, é $\pm$ 0,06 cm. Foram feitas três medidas para cada vazão diferente.

Adotou-se a vazão de 1,19mL.min^{-1} por ser a vazão que fornece o maior sinal. Esta vazão permite, ainda a realização de uma amostragem a cada dois minutos, o que é bem razoável para este tipo de análise.

VII.3.2 Efeito da variação da Temperatura:

Foi estudado o efeito da temperatura na coluna enzimática, na faixa de 20 a 42 °C, sobre a altura do sinal. A temperatura do sistema foi modificada utilizando um banho termostático. Os resultados apresentados foram registrados na Figura VII.4 e Tabela VII.2. Verificou-se que a temperatura altera sensivelmente os resultados.

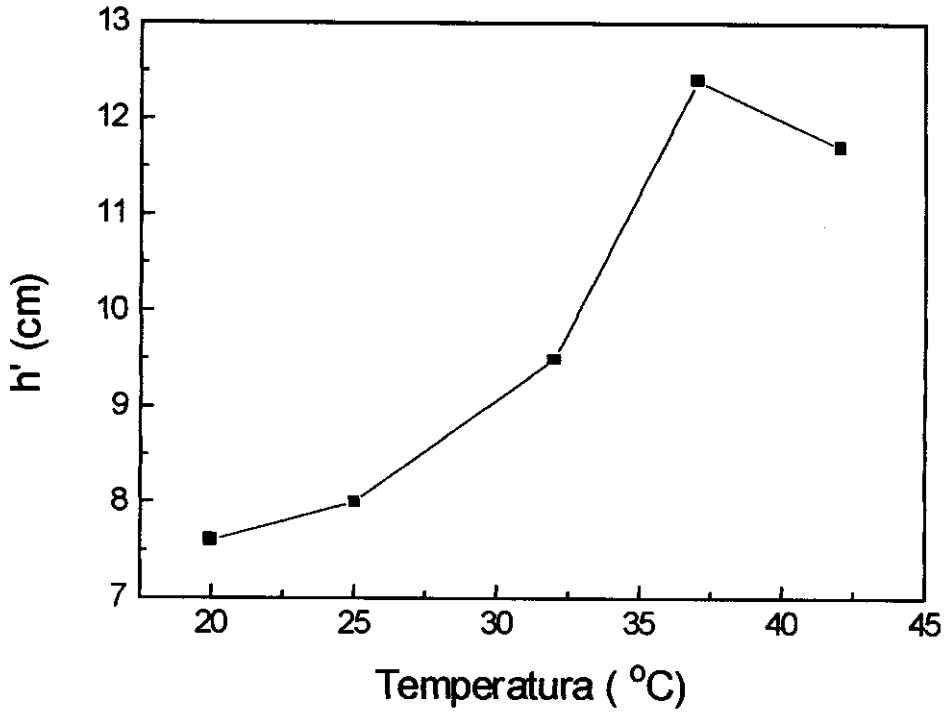


Figura VII.4 - Efeito da temperatura na determinação do paraoxon; h' = diferença entre a altura de pico (cm) de solução de acetilcolina $1,0x10^{-3}$ mol.L^{-1} antes e depois da inibição enzimática pelo pesticida $5,0x10^{-6}$ mol.L^{-1}.

TABELA VII.2

Efeito da temperatura do sistema FIA na determinação do paraoxon.

Velocidade de Fluxo: (FR): $FR_{A1} = FR_{A2} = FR_{A3} = 1.19$ mL.min^{-1}. 1 cm = 8 μS.

Temperatura (^oC)	Altura (A)* (cm)	Altura (B)* (cm)	(A) - (B)* (cm)
20	12,0	4,4	7,6
25	12,1	4,1	8,0
32	14,7	4,2	10,5
37	16,9	4,5	12,4
42	16,2	4,5	11,7

- Altura(A) - Solução de acetilcolina $1x10^{-3}$ mol.L^{-1} antes da inibição da enzima pelo paraoxon $5,0x10^{-6}$ mol.L^{-1}.
- Altura(B) - Solução de acetilcolina $1x10^{-3}$ mol.L^{-1} após a inibição da enzima pelo paraoxon $5,0x10^{-6}$ mol.L^{-1}.
- (A) - (B) - Altura (A) menos Altura(B).

Na Tabela VII.2 pode-se observar facilmente que a enzima não inibida é rapidamente influenciada pela temperatura. A altura (A) aumenta continuamente até 37^{0}C . Em 42^{0}C um pequeno decréscimo é observado, provavelmente devido à denaturação térmica da enzima. Esta suposição foi reforçada pelo fato que após o aquecimento até 42^{0}C a perda da atividade não foi recuperada ao diminuir a temperatura. Ao contrário da enzima não inibida, a atividade da enzima inibida pode ser considerada como independente da temperatura na faixa estudada. A associação de ambos os fatos leva a um aumento da diferença (A-B) com o aumento da temperatura com um máximo em 37^{0}C.

Observou-se que tanto a hidrólise da acetilcolina quanto a inibição da enzima são mais favoráveis a 37^{0}C, que é a temperatura em que a enzima possui maior atividade. Entretanto em temperaturas superiores a 37^{0}C, ocorreu um decréscimo da atividade enzimática, provavelmente devido à denaturação da enzima.

A estimativa do desvio padrão médio, dos valores das alturas, é de ±0,07cm. Foram feitas três medidas para cada temperatura diferente.

VII.3.3 Efeito da Variação da Concentração do Substrato:

Um estudo da variação da concentração do substrato mostrou que inibição aumenta com o aumento da concentração do substrato. Figura VII.5 e Tabela VII.3.

Na Figura VII.5 o eixo das ordenadas corresponde aos valores (A - B), onde os valores de A são obtidos sem a inibição da enzima, e os de B são obtidos com a inibição da enzima. A curva pode ser representada pela equação $\mathbf{h'} = 0{,}131 + 12236{,}25\ \mathbf{C} - 9764213{,}4\ \mathbf{C}^2$ (desvio padrão de r = 0,9857, r^2 = 0,9716), que apresenta coeficiente de correlação de 0,9987. Para esta equação, **h'** representa a diferença de altura de pico (cm) antes e depois da inibição enzimática pelo pesticida e **C** representa a concentração de acetilcolina ($mol.L^{-1}$).

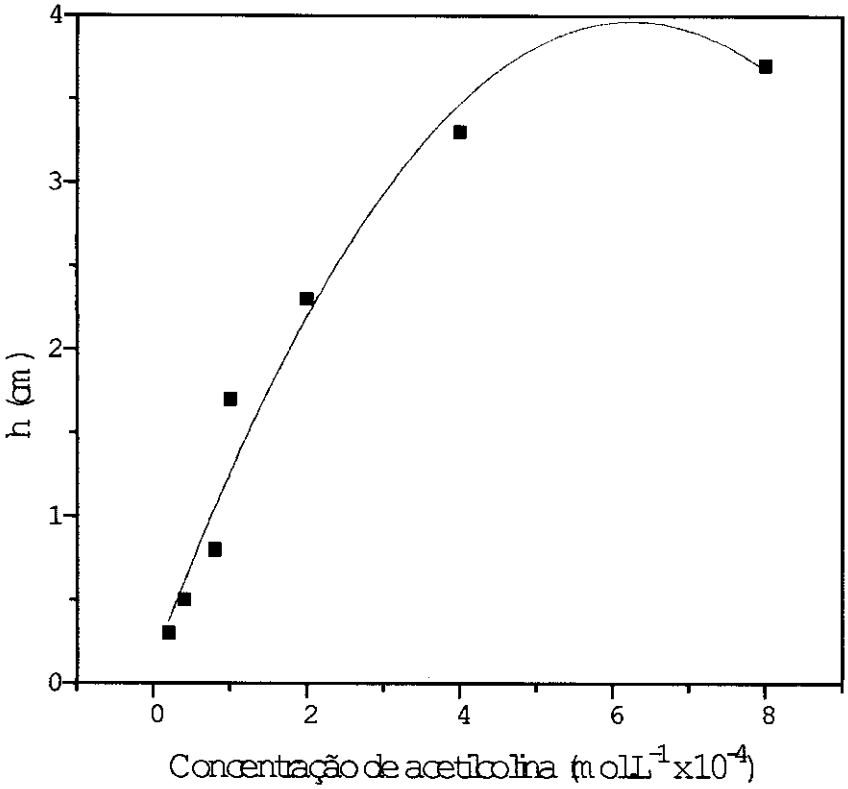


Figura VII.5 - Efeito da concentração do substrato na determinação do paraoxon; h = diferença entre a altura de pico (cm) de solução de acetilcolina (mol.L^{-1}) antes e depois da inibição enzimática pelo paraoxon 5,6 x 10^{-4} mol.L^{-1}.

A Tabela VII.3, mostra o efeito da concentração da acetilcolina na altura do pico em ambos os casos, quando a enzima não está inibida (altura A) e quando a enzima está inibida (altura B). Pode ser observado que em ambos os casos um significante aumento ocorre. A partir de uma solução de acetilcolina 0,2 x 10^{-4} mol.L^{-1} até 8,0 x 10^{-4} mol.L^{-1} o aumento do sinal é maior em (A) (aumenta 6,85 vezes) que em (B) (aumenta 5,2 vezes). Isto leva a um aumento

na diferença (A-B). Este comportamento pode ser entendido da mesma maneira como foi explicado anteriormente nos comentários da Tabela VII.1, com a diferença que neste caso ocorre a variação da concentração e ocorre a variação do tempo de residência como conseqüência do fluxo.

TABELA VII.3

Efeito da concentração da acetilcolina na determinação do paraoxon. Velocidade de Fluxo = 1.19 mL.min^{-1} ($FR_{A1} = FR_{A2} = FR_{A3}$). 1 cm = 8 μS. Temperatura = 25^{0}C.

Concentração de acetilcolina (mol.L^{-1})	ALTURA (A)* (cm)	ALTURA (B)* (cm)	(A)-(B)* (cm)
8,0x10^{-4}	8,9	5,2	3,7
4,0x10^{-4}	8,1	4,8	3,3
2,0x10^{-4}	7,2	4,9	2,3
1,0x10^{-4}	5,1	3,4	1,7
0,8x10^{-4}	3,1	2,3	0,8
0,4x10^{-4}	2,0	1,5	0,5
0,2x10^{-4}	1,3	1,0	0,3

* Altura(A) - solução de acetilcolina antes da inibição da enzima pelo paraoxon 5,0x10^{-6} mol.L^{-1}.

* Altura(B) - solução de acetilcolina após a inibição da enzima pelo paraoxon 5,0x10^{-6} mol.L^{-1}.

* (A) - (B) - Altura (A) menos Altura(B).

VII.3.4 Efeito da variação do Tamanho da Alça de Amostragem:

Foi estudada a influência do tamanho da alça de amostragem, alterando-se o volume de amostra (substrato e inibidor). (Tabela VII.4 e Figura VII.6).

TABELA VII.4

Efeito da variação do volume das soluções de acetilcolina, pesticida e TMB-4, sobre a altura de pico. Temperatura = 25°C. Velocidade de Fluxo = 1,19 mL.min^{-1} . Flow rates: ($FR_{A1} = FR_{A2} = FR_{A3}$). 1,0 cm = 8,0 μS.

Alça	Volume (mL)	Altura(A)* (cm)	Altura(B)** (cm)	(A)-(B)*** (cm)
1	70,0	11,2	5,0	6,2
2	100,0	13,2	3,3	9,9
3	125,0	14,9	3,5	11,4
4	160,0	16,0	3,7	13,2

*Altura(A) - Solução de acetilcolina 1x10^{-3} mol.L^{-1} antes da inibição da enzima pelo paraoxon 5,0x10^{-6} mol.L^{-1}.

**Altura(B) - Solução de acetilcolina 1x10^{-3} mol.L^{-1} após a inibição da enzima pelo paraoxon 5,0x10^{-6} mol.L^{-1}.

***(A) - (B) - Altura (A) menos Altura(B).

- A estimativa do desvio padrão médio, nos valores das alturas, é ±0,1cm. Foram feitas três medidas para cada loop diferente.

Na TABELA VII.4 são apresentados os dados obtidos com o aumento do volume da amostra. Manteve-se a concentração da acetilcolina, do paraoxon e do TMB-4 constantes. A variação do volume introduzido no sistema não muda a concentração mas somente a quantidade de cada composto, isto é, o número de mols. Aumentando o volume de 70 μL para 160 μL a altura do pico (A) da enzima não inibida aumenta continuamente. Observando a altura de pico (B), pode-se observar que o sinal não mais aumenta após 100 μL de solução de paraoxon injetada, ou seja, o máximo inibição é conseguida neste volume. Entretanto a diferença (A-B), que no gráfico é representada por **h'**, é favorecida com o aumento do volume da alça de amostragem, que é o mesmo para todas as soluções introduzidas no sistema.

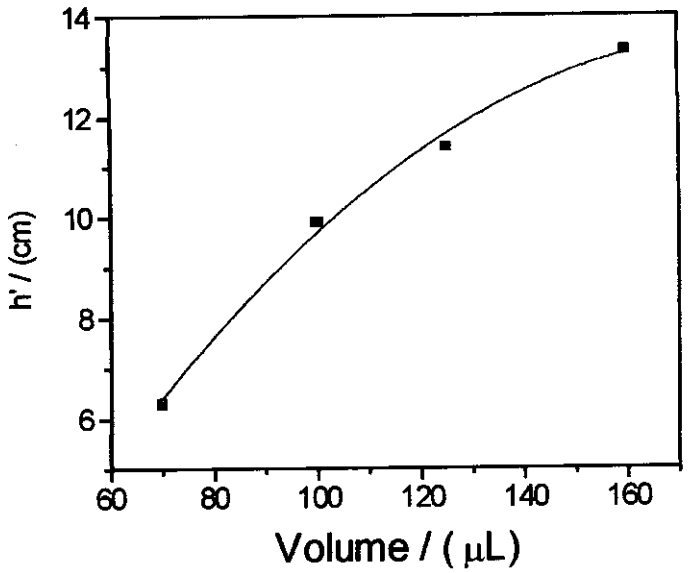


Figura VII.6 -Efeito do volume de substrato na determinação do pesticida; h = diferença entre a altura de pico (cm) de solução de acetilcolina $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ antes e depois da inibição enzimática pelo pesticida $5,6x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$; V = volume do substrato (mL).

Observou-se que ambos, volume do substrato e volume de inibidor influem na intensidade do sinal. A diferença entre a altura de pico antes e depois da inibição aumenta com o aumento do tamanho da alça de amostragem. Entretanto a quantidade de ácido acético formado também está relacionado com a concentração da enzima imobilizada. O volume injetado deve ser suficiente para reagir com a quantidade de acetilcolinesterase imobilizada. A Figura VII.6 pode ser representada pela seguinte equação $\mathbf{h'} = -6{,}587 + 234291{,}84\mathbf{V} - 7{,}083\times10^{8}\,\mathbf{V}^2 + 0{,}155\mathbf{N}^3$, e coeficiente de regressão polinomial de r = 0,999, $r_1^2 = 0{,}999$.

VII.3.5 Efeito da Concentração de TMB-4:

Observou-se que a concentração de TMB-4 afeta tanto na influência da reativação enzimática como na velocidade de reativação da enzima. Para as faixas de concentração de pesticida e acetilcolina estudadas, verificou-se que a porcentagem de reativação aumenta com o aumento da concentração de TMB-4 injetada, sendo completa para concentrações $\geq 5 \times 10^{-5}$ mol.L^{-1}.

VII.4 NÚMERO DE DETERMINAÇÕES DE PARAOXON:

A partir dos resultados obtidos para a determinação de paraoxon pelo método condutimétrico, pode ser considerado que o método é rápido, e pode ser amplamente satisfatório para análises quantitativas de paraoxon, nesta faixa de

concentração considerada. Cerca de 10 determinações podem ser desenvolvida por hora, utilizando vazão de 1,19 $mL.min^{-1}$.

VII.5 DETERMINAÇÃO CONDUTIMÉTRICA DE PARAOXON POR FIA / STOPPED-FLOW COM ENZIMA ACETILCOLINESTERASE IMOBILIZADA.

Também foi proposto e desenvolvido um sistema "FIA-stopped-flow" para detecção quantitativa do dietil-p-nitrofenilfosfato (paraoxon).

Para a utilização do sistema condutimétrico "stopped-flow" , empregou-se uma parada do fluxo no instante em que a solução do pesticida entra em contato com a enzima. As paradas permitem maior tempo de contato entre a enzima e o inibidor, e portanto maior porcentagem de inibição.

O sistema "stopped-flow" foi estudado de forma a obter uma maior capacidade de inibição em função do tempo de parada, em uma faixa linear de concentração de pesticida. Entretanto, tempos muito longos (maiores que 30 min.) podem causar denaturação da enzima.

Foram conduzidos testes de inibição utilizando diferentes concentrações de pesticida e sucessivas recuperações da atividade da enzima. A correlação entre a diferença de pico versus concentração de paraoxon, é linear na faixa de $5,0x10^{-9}$ $mol.L^{-1}$ a $1,0x10^{-7}$ $mol.L^{-1}$ (Figura VII.7). O sistema apresentou um limite de detecção de $5,0x10^{-9}$ $mol.L^{-1}$ para o pesticida.

A curva segue a equação $\mathbf{h'} = 3,522x10^{7}\ \mathbf{C} + 1,103$ com coeficiente de correlação 0,9916. **h'** representa a diferença entre a altura de pico (cm) antes e

depois da inibição da enzima pelo pesticida. **C** representa a concentração de paraoxon (mol.L^{-1}). Quando se utiliza "stopped-flow", são necessárias maiores concentrações de TMB-4. Para o tempo de parada de 2 minutos, foram utilizadas soluções de $5{,}0\times10^{-4}$ mol.L^{-1} de TMB-4. Como é observado na Figura VII.7, nestas condições, a recuperação da atividade da coluna enzimática é facilmente efetuada.

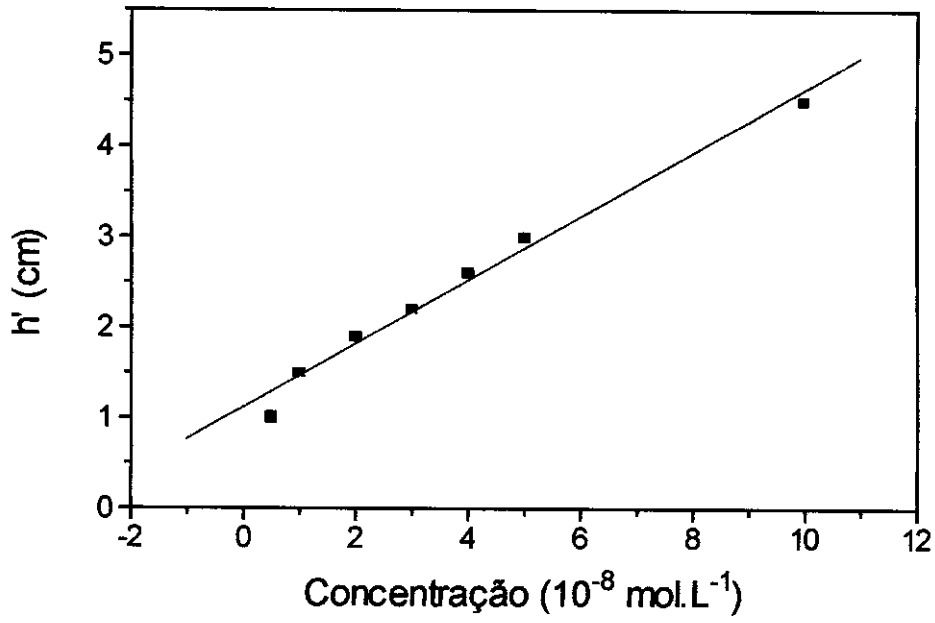


Figura VII.7 - Curva calibração para o paraoxon na faixa de $5{,}0\text{x}10^{-9}$ mol.L^{-1} a $1{,}0\text{x}10^{-7}$ mol.L^{-1} escrita pela equação **h'** = $3{,}522\text{x}10^{7}$ **C** + 1,103 com uma correlação de 0,9987. Para a equação, **h'** = diferença entre a altura de pico (cm) antes e depois da inibição enzimática pelo pesticida e **C** = concentração de paraoxon (mol.L^{-1}). A reativação da acetilcolinesterase foi feita com uma solução $5{,}0\text{x}10^{-5}$ mol.L^{-1} de TMB-4. Alça de amostragem de Polietileno com volume de 100 μL (1,0mm i.d.) em todos os casos. Condutância: 1 cm = 8μS.

O método apresentou estimativa do desvio padrão relativo 1,6% (n = 8) para uma solução $1{,}0\times10^{-3}$ mol.L^{-1} de acetilcolina e uma solução de $5{,}0\times10^{-6}$ mol.L^{-1} de paraoxon.

Capítulo VIII

Determinação de Paraoxon pelo Método Espectrofotométrico

VIII.1 - Precisão e Sensibilidade do Método.

VIII.2 - Efeito da Variação de Condições do Sistema FIA.

VIII. DETERMINAÇÃO DO PARAOXON PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Da mesma maneira que para o método condutimétrico, o mesmo sistema FIA utilizado na determinação de acetilcolina, é utilizado na determinação de paraoxon, pelo método espectrofotométrico.

A Figura VIII.1 mostra uma curva típica de determinação do pesticida pelo método de FIA e reativação da colinesterase com TMB-4 $5x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$, após inibição pelo paraoxon.

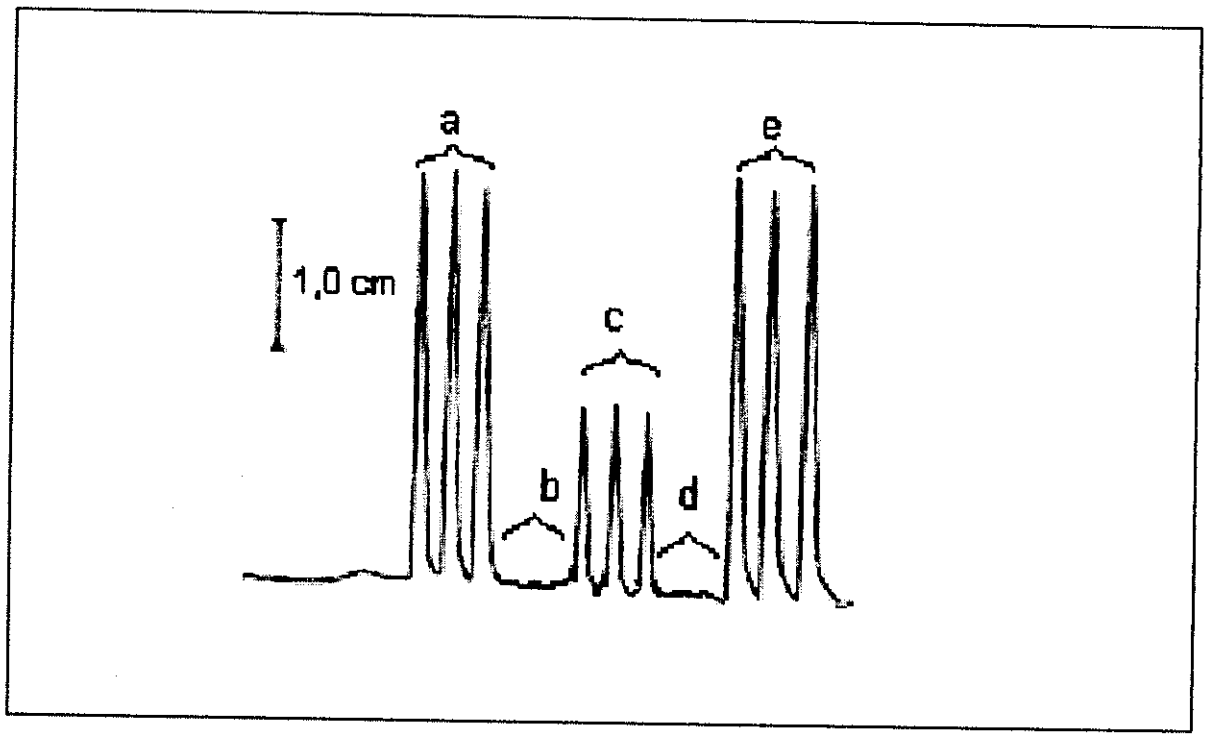


Figura VIII.1 - Típica curva de determinação de pesticida pelo método de FIA e reativação da colinesterase com TMB-4 após inibição pelo paraoxon. Da esquerda para a direita: (a) sinais em triplicata de solução padrão de acetilcolina $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ antes da inibição do paraoxon, (b) solução de paraoxon $5x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ e (c) sinais em triplicata de solução padrão de acetilcolina $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ depois da inibição do paraoxon, (d) solução deTMB-4 $5x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$. Alça de amostragem com volume de 100μL (1,0 mm d.i.). absorbância:400nm.

VIII.1 PRECISÃO E SENSIBILIDADE:

De acordo com os dados obtidos, o método apresenta relação linear entre absorbância e concentração de pesticida na faixa de $5x10^{-7}$ $mol.L^{-1}$ a $5x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$ e limite de detecção $1x10^{-7}$ $mol.L^{-1}$. A Figura VIII.2 mostra uma relação linear entre condutividade e a concentração de paraoxon.

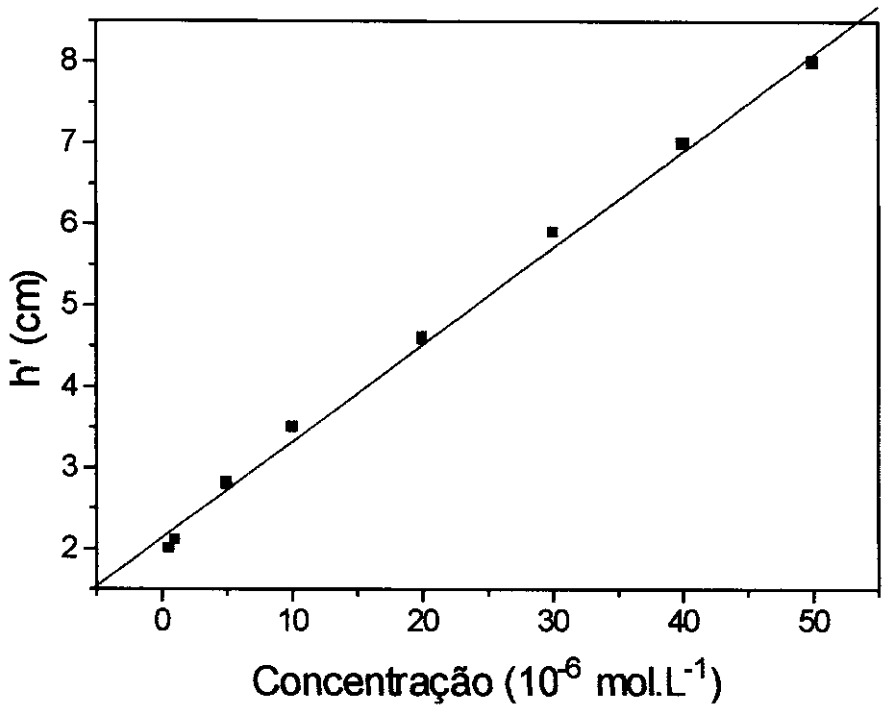


Figura VIII.2 - Curva de relação linear entre absorbância e concentração de paraoxon na faixa de $5x10^{-7}$ $mol.L^{-1}$ a $5x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$; h' = diferença entre a altura de pico (cm) antes e depois da inibição pelo pesticida. Regeneração feita com solução de TMB-4 $5x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$. Alça de amostragem com volume de 100 μL (1,0mm d.i.).

A curva pode ser representada pela equação **h'** = $0,119x10^{6}$ **C** + 2,111, e apresenta coeficiente de correlação de 0,9979. Na equação **h'** representa a diferença entre a altura de pico (cm) antes e depois da inibição da enzima pelo pesticida, e **C** representa a concentração de acetilcolina (mmol.L^{-1}).

Para determinar o desvio padrão relativo do método entre medidas de uma mesma concentração de pesticida, utilizou-se medidas de padrão de acetilcolina $5x10^{-3}$ mol.L^{-1}, solução de paraoxon $5x10^{-6}$ mol.L^{-1} e solução de TMB-4 $5x10^{-5}$ mo.L^{-1}. O desvio padrão relativo entre as medidas foi de ±1,7% (n=10).

VIII.2 EFEITO DA VARIAÇÃO DE CONDIÇÕES DO SISTEMA FIA:

Para otimizar o método espectrofotométrico na determinação de paraoxon, também foram realizadas medidas variando as condições do sistema FIA. Como já feito nos casos anteriores, foram estudadas as influências: da vazão, da temperatura do reator enzimático, do tamanho da alça de amostragem, da concentração do substrato.

VIII.2.1 Efeito da Variação da Vazão:

Da mesma maneira que para o método anterior (determinação condutimétrica de paraoxon) , foram realizadas medidas de determinação do pesticida variando a vazão do sistema. Observou-se que as respostas variam sensivelmente de acordo com a vazão. (Figura VIII.3, Tabela VIII.1).

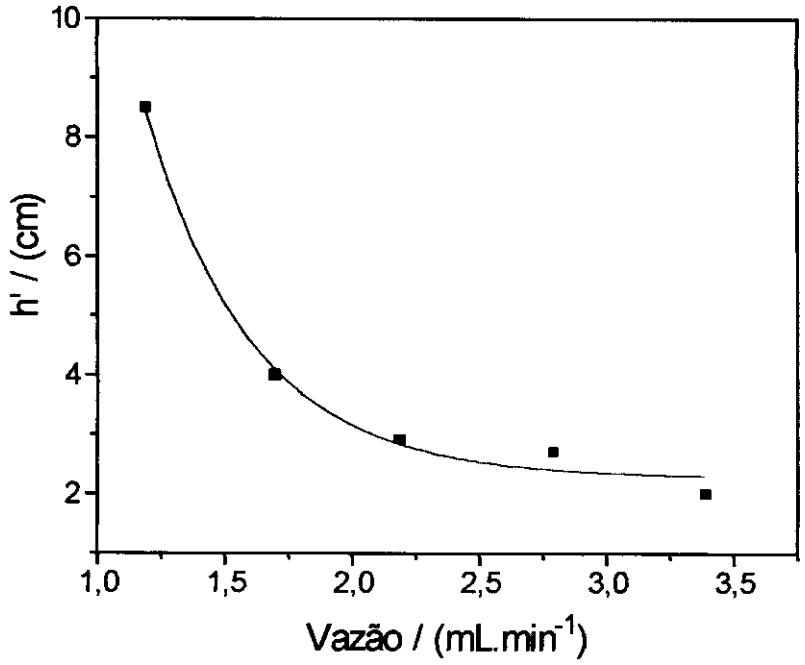


Figura VIII.3 - Efeito da vazão na determinação do paraoxon. Solução de acetilcolina $1,0\times10^{-3}$ mol.L^{-1}. h' = diferença entre a altura de pico (cm) antes e depois da inibição pelo paraoxon (solução 5×10^{-5} mol.L^{-1}). Regeneração feita com solução de TMB-4 5×10^{-5} mol.L^{-1}. Alça de amostragem com volume de 100μL (1,0 mm d.i.). Absorbância:400nm.

A curva pode ser representada pela equação **h'** = 7,617 - 5,283 **F** + 1,045 $\mathbf{F}^2$, e apresenta coeficiente de correlação de r =0,9985, r^2 =0,9971. Na equação, **h'** representa a diferença entre a altura de pico (cm) antes e depois

da inibição da enzima pelo pesticida, e **F** representa a variação da vazão($mL.min^{-1}$).

A Tabela VIII.1 mostra o efeito da variação da vazão (FR_{A1} = FR_{A2} = FR_{A3}) sobre a altura de pico e sobre a diferença da altura antes e depois da inibição enzimática com o paraoxon.

TABELA VIII.1

Efeito da vazão (FR) (FR_{A1} = FR_{A2} = FR_{A3}) na determinação do paraoxon. Temperatura = 25°C. 1 cm = 8 μS.

Velocidade de Fluxo/($mL.min^{-1}$)	Altura (A)*/cm)	Altura (B)*/cm)	(A) - (B)*/cm)
1,19	4,2	1,7	2,5
1,70	2,8	1,3	1,5
2,19	2,5	1,2	1,3
2,79	2,2	1,0	1,2

- Altura(A) : solução de acetilcolina $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ antes da inibição da enzima pelo pesticida.
- Altura(B) : solução de acetilcolina $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ após a inibição da enzima pelo pesticida.
- (A) - (B) : altura (A) menos altura(B).

Na Tabela VIII.1 pode ser observado a influência da variação da vazão sobre a altura do sinal. De maneira similar ao método condutimétrico, a altura A antes da inibição com o paraoxon (A), mostra um grande aumento com o

decréscimo da vazão. A altura (B), após a inibição com paraoxon, também mostra um aumento com o decréscimo da vazão.

Estes aumentos também podem ser atribuídos a dois fatores, da mesma maneira como já foi explicado anteriormente para o método condutimétrico, ou seja, a diminuição do fluxo aumenta o tempo de contato do substrato com a enzima, favorecendo assim o rendimento da reação, e aumenta o tempo que a solução doadora permanece na cela de permeação, permitindo maior difusão do ácido acético através da membrana.

Na altura (B) o fator de aumento a partir da velocidade de fluxo 2,79 mL .min^{-1} [(B) = 1,7 cm] para a velocidade de fluxo 1,19 mL min^{-1} [(B) = 1,3 cm] é 1,3. Comparativamente o fator de aumento da altura (A) referente às mesmas vazões é 4,2 cm/ 2,2 cm = 1,9.

Da mesma forma que para o método condutimétrico, a altura B é também alterada pelo tempo em que o pesticida permanece em contado com a colinesterase.

De maneira similar ao método condutimétrico, podemos notar que o compromisso entre (A) e (B), que é (A-B), conduz a um significante aumento a baixos fluxos, uma vez que a atividade enzimática não depende do método de detecção, e sim do sistema FIA empregado.

A estimativa do desvio padrão médio, nos valores das alturas, é $\pm$ 0,06 cm. Foram feitas três medidas para cada vazão diferente.

VIII.2.2 Efeito da Variação da Temperatura

O efeito da temperatura na coluna enzimática, na faixa de 20 a 42 °C, sobre a altura do sinal é representado na Figura VIII.4. De maneira similar ao método condutimétrico, observou-se que a atividade da enzima é influenciada pela temperatura. Verificou-se que a atividade da mesma aumenta com o aumento da temperatura até aproximadamente 37 ^{0}C pelo aumento da diferença (A-B). Entretanto em temperaturas superiores a 37 ^{0}C observou-se que um decréscimo é observado, provavelmente devido a denaturação térmica da enzima.

A temperatura do sistema foi modificada utilizando um banho termostático (Figura V.3). Os resultados apresentados foram registrados na Figura VIII.4 e Tabela VIII.2.

Na Figura VIII.4 a curva pode ser representada pela equação **h'** = - 2,2474 + 0,2245 **T** - 0,0029 $\mathbf{T^2}$, e apresenta coeficiente de correlação de r =0,9925, r^2 =0,988. Na equação **h'**, representa a diferença entre a altura de pico (cm) antes e depois da inibição da enzima pelo pesticida, e **T** representa a temperatura (°C).

A estimativa do desvio padrão médio, nos valores das alturas, é de ±0,05cm. Foram feitas três medidas para cada temperatura diferente.

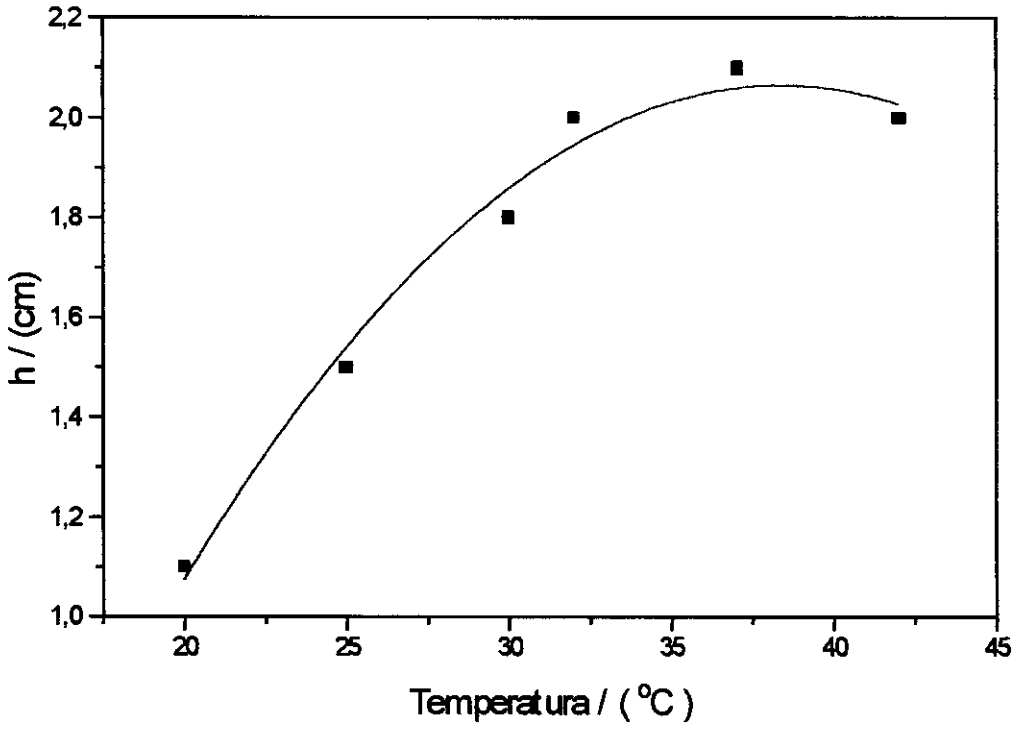


Figura VIII.4 - Efeito da temperatura na determinação do paraoxon; h = diferença entre a altura de pico (cm) de solução de acetilcolina $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ antes e depois da inibição enzimática pelo paraoxon (solução $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$). Alça de amostragem com volume de 100µL (1,0 mm d.i.). absorbância:400nm.

TABELA VIII.2

Efeito da temperatura do sistema FIA na determinação do paraoxon.

Velocidade de Fluxo: (FR): $FR_{A1} = FR_{A2} = FR_{A3} = 1,19$ mL.min^{-1}. 1 cm = 8 μS.

Temperatura/(^{o}C)	Altura (A)*/(cm)	Altura (B)*/(cm)	(A) - (B)*/(cm)
20	2,8	1,7	1,1
25	3,2	1,7	1,5
30	3,3	1,5	1,8
32	3,6	1,6	2,0
37	3,7	1,6	2,1
42	3,5	1,5	2,0

- Altura(A) - Solução de acetilcolina $1x10^{-3}$ mol.L^{-1} antes da inibição da enzima pelo paraoxon $5,0x10^{-6}$ mol.L^{-1}.
- Altura(B) - Solução de acetilcolina $1x10^{-3}$ mol.L^{-1} após a inibição da enzima pelo paraoxon $5,0x10^{-6}$ mol.L^{-1}.
- (A) - (B) - Altura (A) menos Altura(B).

VIII.2.3 Efeito da Variação da Concentração do Substrato:

Um estudo da variação da concentração do substrato mostrou que a porcentagem (%) de inibição aumenta com o aumento da concentração do substrato. Figura VIII.5 e Tabela VIII.3.

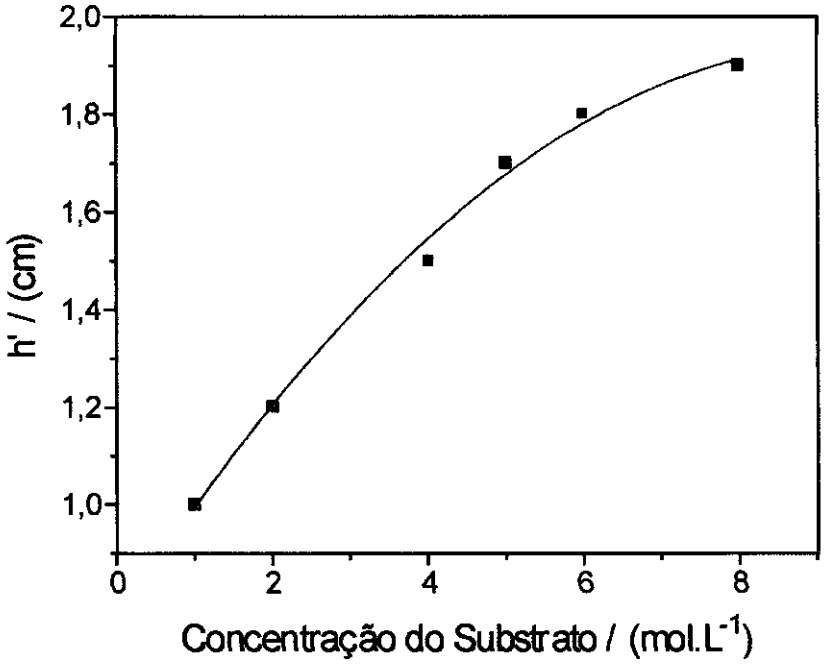


Figura VIII.5 - Efeito da concentração do substrato na determinação do paraoxon; h' = diferença entre a altura de pico (cm) antes e depois da inibição pelo paraoxon (solução $5x10^{-5}$ mol.L^{-1}). Regeneração feita com solução de TMB-4 $5x10^{-5}$ mol.L^{-1}. Alça de amostragem com volume de 100μL (1,0 mm d.i.). Absorbância:400nm.

A curva pode ser representada pela equação **h'** = 0,7556 - 0,2491**C** - 0,01308 $\mathbf{C}^2$, e apresenta coeficiente de correlação de r =0,9975, r^2 =0,9950. Na equação **h'**, representa a diferença entre a altura de pico (cm) antes e depois da inibição da enzima pelo pesticida, e **C** representa a concentração de acetilcolina (mol.L^{-1}).

A Tabela VIII.3 mostra o efeito da concentração da acetilcolina na altura do pico em ambos os casos, quando a enzima não está inibida (altura A) e quando a enzima está inibida (altura B). Pode ser observado que em ambos os casos um significante aumento ocorre. A partir de uma solução de acetilcolina 2,0 x 10^{-3} mol.L^{-1} até 8,0 x 10^{-3} mol.L^{-1} o aumento do sinal é maior em (A)

(aumenta 2.9 vezes) que em (B) (aumenta 2,3 vezes). Isto leva a um aumento na diferença (A-B). Este comportamento pode ser entendido da mesma maneira como foi explicado anteriormente nos comentários sobre os dados mostrados na Tabela VII.2, com a utilização do método condutimétrico.

TABELA VIII.3 - Efeito da concentração da acetilcolina na determinação do paraoxon. Temperatura = 25^{0}C. Vazão = 1,19 mL.min^{-1} ($FR_{A1} = FR_{A2} = FR_{A3}$).1 cm = 8 μS.

Conc.acetilcolina (mol.L^{-1})	**ALTURA (A)* (cm)**	**ALTURA (B)* (cm)**	**(A)-(B)* (cm)**
8,0x10^{-3}	3,5	1,6	1,9
6,0x10^{-3}	3,4	1,6	1,8
5,0x10^{-3}	3,3	1,6	1,7
4,0x10^{-3}	3,1	1,4	1,5
2,0x10^{-3}	2,6	1,4	1,2
1,0x10^{-3}	2,3	1,3	1,0

- Altura(A) - solução de acetilcolina antes da inibição da enzima pelo paraoxon 5,0x10^{-6} mol.L^{-1}.
- Altura(B) - solução de acetilcolina após a inibição da enzima pelo paraoxon 5,0x10^{-6} mol.L^{-1}.
- (A) - (B) - Altura (A) menos Altura(B).

VIII.2.4 Efeito da Variação do Tamanho da Alça de Amostragem:

Foi estudada a influência do tamanho do Loop, alterando-se o volume de amostra (substrato e inibidor). (Tabela VIII.4 e Figura VIII.6).

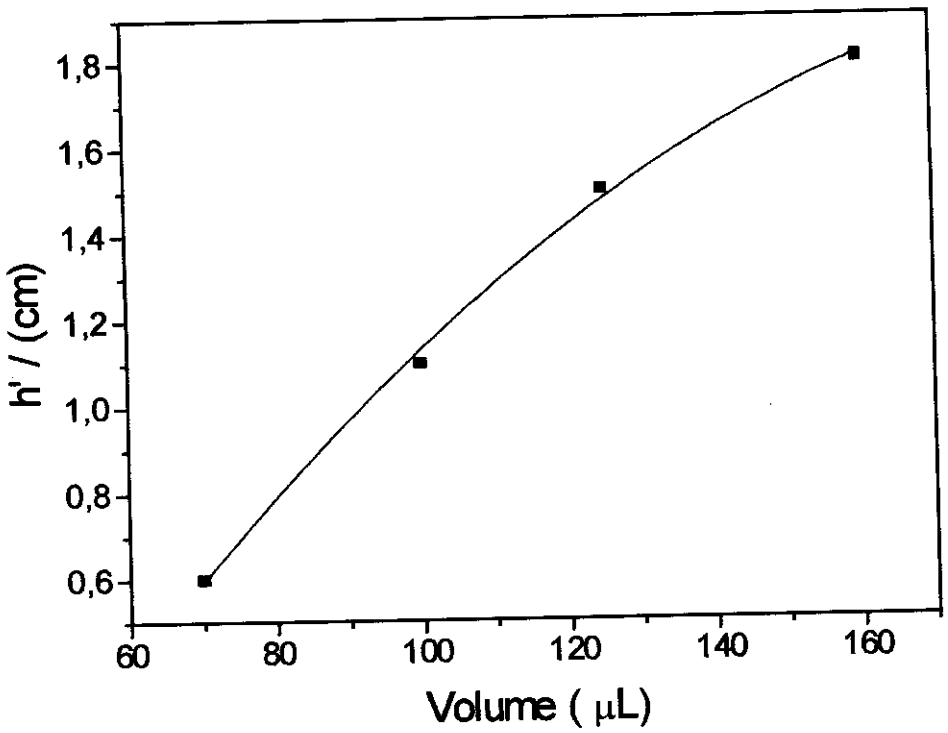


Figura VIII.6 - Efeito do volume de substrato na determinação do pesticida; h' = diferença entre a altura de pico (cm) de solução de acetilcolina $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol.L^{-1} antes e depois da inibição enzimática de solução de paraoxon 5×10^{-6} mol.L^{-1} ; V = volume de solução de acetilcolina (μL) (substrato).

Observou-se que ambos, volume do substrato e volume de inibidor devem afetar o rendimento da reação enzimática, onde a diferença entre a altura de pico, antes e depois da inibição, aumenta com o aumento do tamanho

da alça de amostragem. Entretanto a quantidade de ácido acético formado também está relacionada com a concentração da enzima imobilizada. O volume injetado deve ser suficiente para reagir com a quantidade de colinesterase imobilizada.

TABELA VIII.4

Efeito da variação do volume das soluções de acetilcolina, pesticida e TMB-4, sobre a altura de pico. Temperatura = 25°C. 1,0 cm = 8,0 μS. Fluxo = 1,19 mL.min^{-1} ($FR_{A1} = FR_{A2} = FR_{A3}$).

Loop	Volume (mL)	Altura(A)* (cm)	Altura(B)** (cm)	(A)-(B)*** (cm)
1	70	2,2	1,6	0,6
2	100	2,8	1,7	1,1
3	125	3,3	1,8	1,5
4	160	3,6	1,8	1,8

*Altura(A) - Solução de acetilcolina 1x10^{-3} mol.L^{-1} antes da inibição da enzima pelo paraoxon 5,0x10^{-6} mol.L^{-1}.
**Altura(B) - Solução de acetilcolina 1x10^{-3} mol.L^{-1} após a inibição da enzima pelo paraoxon 5,0x10^{-6} mol.L^{-1}.
***(A) - (B) - Altura (A) menos Altura(B).

- A estimativa do desvio padrão médio, nos valores das alturas, é ±0,1cm. Foram feitas três medidas para cada alça de amostragem diferente.

Na TABELA VIII.4 são apresentados os dados obtidos com o aumento do volume da solução de acetilcolina. A concentração da acetilcolina, do paraoxon e do TMB-4 são constantes conforme pode ser observado na TABELA VIII.4. De maneira similar ao método condutimétrico, podemos observar que aumentando o volume de 70 μL para 160 μL a altura do pico (A), referente à enzima não inibida, aumenta continuamente. Observando a altura de pico (B), pode-se verificar que o sinal não mais aumenta mais significantemente com o incremento no volume do substrato. Como consequência a diferença (A-B) é favorecida com o aumento do volume da alça de amostragem, que é o mesmo para todas as soluções introduzidas no sistema.

A curva pode ser representada pela equação $\mathbf{h'} = -1{,}168 + 0{,}03032\ \mathbf{V} - 7{,}277\ \mathbf{V}^2$, e apresenta coeficiente de correlação de r =0,9995, r^2 =0,9981. Na equação, **h'** representa a diferença entre a altura de pico (cm) antes e depois da inibição da enzima pelo pesticida, e **C** representa a concentração de acetilcolina ($mol.L^{-1}$).

Capítulo IX

Conclusão

IX.1 - Sistema FIA condutimétrico.

IX.2 - Sistema Condutimétrico FIA – Stoppep – Flow.

IX.3 - Sistema FIA Espectrofotométrico.

IX.4 - Comparação entre os dois Métodos Imobilização.

IX. CONCLUSÕES:

IX.1 Sistema FIA Condutimétrico:

A aplicação do sistema FIA condutimétrico para a determinação de acetilcolina e paraoxon, com a utilização de enzima imobilizada e membrana de permeação apresenta as seguintes características:

* Este método possui rapidez e facilidade de manuseio, não requer longos períodos de espera entre a introdução da acetilcolina e o pesticida no sistema, e não necessita de etapas de pré-concentração.

* A reativação da acetilcolinesterase pela solução de TMB-4 é rápida e completa. Cerca de 10 análises podem ser desenvolvidas em 1 hora na determinação de paraoxon.

* Cerca de 20 análises por hora para a determinação de acetilcolina.

* O sistema proposto é facilmente operado, requer apenas pequenas quantidades de reagente, uma vez que pequenos volumes de amostra são utilizados.

* O reator enzimático pode ser reutilizado por mais de 100 vezes sem perda da atividade.

* O sistema FI utilizado é de baixo custo.

* A utilização da técnica de difusão através de membrana juntamente com o uso de enzima, torna o sistema bastante seletivo.

* O método pode ser aplicado em diferentes áreas de análise (médica, ambiental, alimentícia).

Sensibilidade e Reprodutibilidade do Método:

* Boa sensibilidade, com concentrações mínimas detectáveis para acetilcolina (limite de detecção de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L^{-1}) e para o paraoxon (limite quantitativo de detecção de $1x10^{-7}$ mol.L^{-1} , e um limite de detecção semi-quantitativo de $1x10^{-8}$ mol.L^{-1}).

* Os resultados da aplicação deste método para determinação de acetilcolina em um preparado de formulação farmacêutica incluindo a aplicação do teste de recuperação pelo método de adição padrão mostrou uma boa exatidão, com erro máximo de 7,1% (n=3).

* Boa precisão, para ambas as determinações de acetilcolina (desvio padrão relativo de 1,8% (n=14) para uma solução 1,0 x 10^{-3} mol.L^{-1} de acetilcolina) e paraoxon (desvio padrão relativo de 2,2% (n=8) para uma solução 1,0 x 10^{-3} mol.L^{-1} de acetilcolina e 5,0 x 10^{-6} mol.L^{-1} de paraoxon) com relação linear entre condutividade e concentração do substrato na faixa de 1,0 x 10^{-3} mol.L^{-1} a 1,0 x 10^{-5} mol.L^{-1} e do pesticida na faixa de 1,0 x 10^{-5} mol.L^{-1} a 1,0x10^{-7} mol.L^{-1}.

IX.2 Aplicação do Sistema "FIA / Stopped Flow" para o Sistema Condutimétrico.

Sensibilidade e Reprodutibilidade do Método:

* O sistema "FIA-Stopped Flow" foi estudado para obter uma maior capacidade de inibição em função do tempo de parada, em uma faixa linear de concentração de pesticida. Observou-se um aumento da sensibilibidade do método com o aumentando o tempo de contato entre a enzima e o pesticida, favorecendo uma maior inibição da acetilcolinesterase.

* O método apresenta limite de detecção de 5,0×10^{-9} mol.L^{-1} para soluções de paraoxon

* A correlação entre a diferença de altura de pico versus concentração de paraoxon, é linear na faixa de 1,0×10^{-7} mol.L^{-1} a 5,0×10^{-9} mol.L^{-1}, e desvio

padrão relativo de 1,6 % (n=8) para uma solução de $1,0\times10^{-3}$ mol.L^{-1} de acetilcolina com uma solução de $5,0\times10^{-6}$ mol.L^{-1} de paraoxon.

IX.3 Sistema FIA Espectrofotométrico:

A aplicação do sistema FIA espectofotométrico para a determinação de acetilcolina e paraoxon, com a utilização de enzima imobilizada e membrana de permeação apresenta:

Sensibilidade e Reprodutibilidade do Método:

* Boa sensibilidade, com concentrações mínimas detectáveis para acetilcolina (limite de detecção $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L^{-1}) e para o paraoxon (limite de detecção de $5,0\times10^{-7}$ mol.L^{-1} e um limite de detecção semi-quantitativo de 1×10^{-7} mol.L^{-1}).

* A aplicação em preparado farmacêutico, verificada por teste de recuperação utilizando o método de adição padrão, mostrou uma exatidão satisfatória, com um erro no máximo de 6,2% (n=3).

* O método apresenta boa precisão, para ambas as determinações (desvio padrão relativo de 2,5%, para uma solução de acetilcolina $5,0 \times 10^{-3}$ (n=8)), e paraoxon (desvio padrão relativo de 1,7%, (n=10) para uma solução de acetilcolina mol.L^{-1} $5,0 \times 10^{-3}$ mol.L^{-1} e uma solução de $5,0 \times 10^{-6}$ mol.L^{-1} de

paraoxon). Foi encontrada uma faixa linear de concentração de acetilcolina versus altura de pico entre $1,0\times10^{-4}$ mol.L^{-1} a $5,0\times10^{-3}$ mol.L^{-1}, e uma faixa linear de concentração de paraoxon versus altura de pico entre $1,0\text{x}10^{-7}$ mol.L^{-1} a $1,0\text{x}10^{-5}$ mol.L^{-1}.

IX.4 Comparação entre os dois sistemas FIA de detecção (condutométrico e espectrofotométrico) na determinação de acetilcolina e paraoxon:

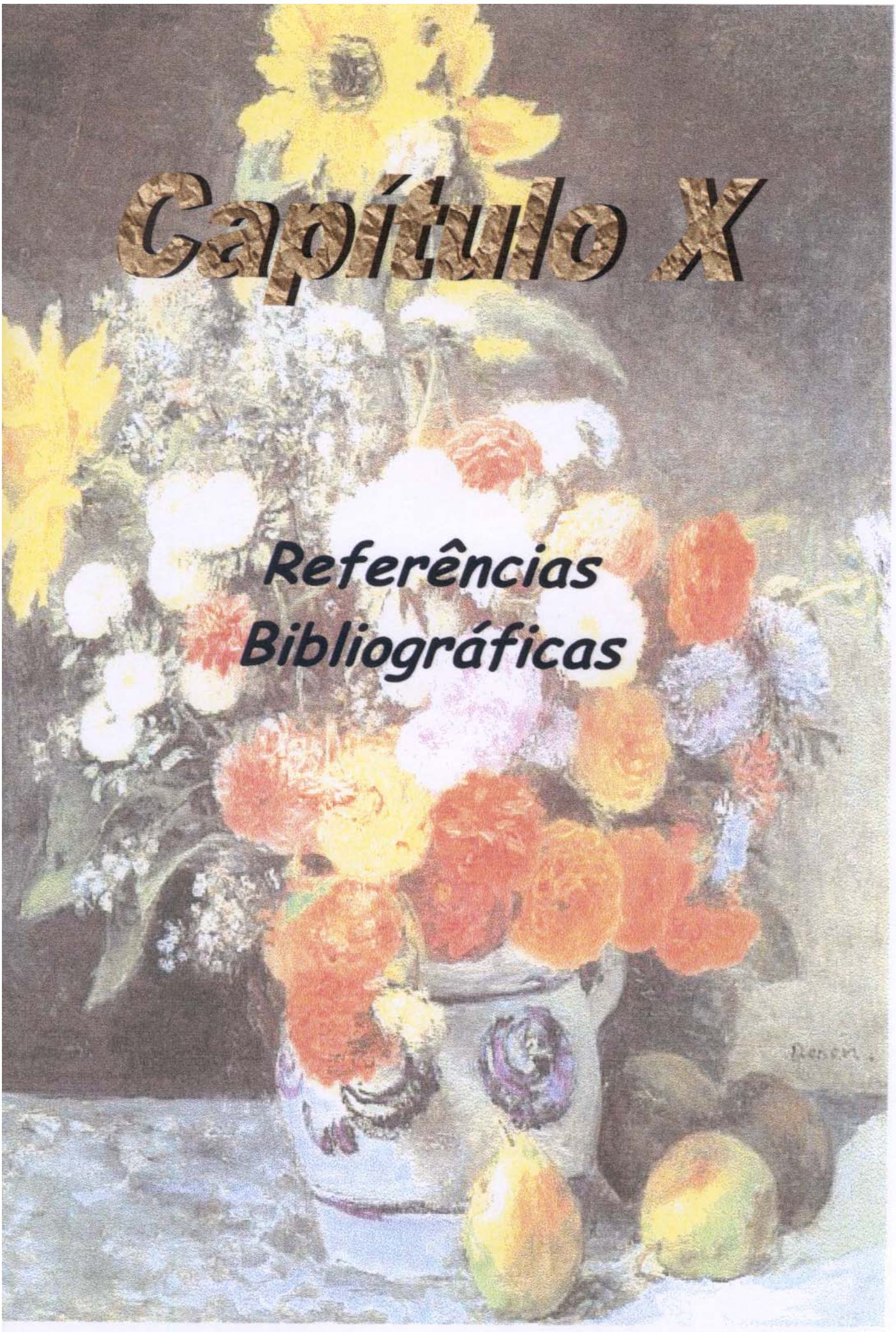
* Ambos possuem precisão e exatidão satisfatórias, embora o método condutimétrico seja mais sensível que o método espectrofométrico cerca de 5 vezes, tanto na determinação quantitativa de acetilcolina, quanto na determinação quantitativa de paraoxon.

* Todas as outras características anteriormente citadas para o método condutimétrico são igualmente válidas para o método espectrofotométrico.

IX.5 Comparação entre os dois métodos de imobilização ("CPG" e sílica gel modificada) da enzima acetilcolinesterase para determinação de acetilcolina:

* Ambos os métodos apresentam boa sensibilidade e reprodutibilidade, embora o método de imobilização em "CPG" seja mais sensível que o método de imobilização em sílica gel modificada.

* O método de imobilização em "CPG" permite uma maior utilização da coluna enzimática (possui tempo de vida maior cerca de 2 vezes maior).



Capítulo X

Referências Bibliográficas

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1) Stryer, L., *"Bioquímica"*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1990, cap. 38.

2) Brestkin, A . P., Brick, I. J., e Grigoréva, G. M., *"International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics"*, Pergamon Press, Oxford, 1973, pp. 241.

3) Voet, D. e Voet, J. G., *"Biochemistry"*, John Wileyes, New York, 1990, cap 34.

4) Guyton, A. C., *"Tratado de Fisiologia Médica"*, Interamericana Ltda, Rio de Janeiro, 1984, cap. 12.

5) Eto, M., "*Organophosphorus Pesticides and Biological Chemistry*" , CRC Press, Boca Raton, 1979, pp.123.

6) Stryer, L., *"Bioquímica"*, Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1990, cap. 8.

7) Aldridge, W. N., e Reiner, E., *"Enzyme Inhibitors as Substrate for Interactions of Esterases with Esters of Organophosphorous Compounds and Carbamic Esters"* , Elsevier, New York, 1975.

8) Hassall, K. A., *"The Chemistry of Pesticides"* , Verlag Chemie, Weinheim, 1982, pp.67-119.

9) Poziomek, E. J., Hackley, B. E. Jr., e Steinberg, G. M., Pyridinium Aldoximes, **J. Org. Chem.**, 1958, **23(5)**, 714.

10) Garcia-de-Maria, C., Manzano-Muñoz, T., e Townshend, A., Reactivation of an immobilized enzyme reactor for the determination of acetylcholinesterase inhibitors for flow injection determination of paraoxon, **Anal. Chim. Acta**, 1994, **295(3)**, 287.

11) Takruni, I. A., Almuaibed, A. M., e Townshend, A., Flow-injection study of inhibition and reactivation of immobilized acetylcholinesterase: determination of the pesticides paraoxon and carbamoylcholine, **Anal. Chim. Acta**, 1993, **282(1)**, 3.

12) Shi, R., e Stein., K., Flow injection analiysis of paraoxon with the use of an immobilized acetylcholinesterase reactor, **Anal. Chim. Acta**, 1996, **324(12)**, 21.

13) Marco, M. P., e Barceló, D., Review Article - Environmental applications of analytical biosensors, **Meas. Sci. Technol.**, 1996, **7(10)**, 1547.

14) Turner, A. P. F., Karube, I., e Wilson, G. S., *"Biosensors: Fundamentals and applications"*, Oxford Science Publications, Oxford, 1986, pp.737.

15) Guilbault, G. G., e Oliveira Neto, G., *"Immobilized enzyme electrodes, in Immobilized cells and enzymes: A practical appoach"*, J. Woodward, Ed., IRL Press, Oxford, 1985, Cap. 5.

16) Guilbault, G. G., *"Analytical Uses of Immobilized Enzymes"*, Marcel Dekker, New York, 1984, pp. 78.

17) Guilbault, G. G., *"Analytical Uses of Immobilized Enzymes"*, Marcel Dekker, New York, 1984, Cap. 3.

18) Sharma, A . e Roger, K.R., Review Article - Biosensors , **Meas. Sci. Technol.** , 1994, **5 (12)**, 461.

19) Guibault, G. G., *"Analytical Applications of Enzymes"*, American Chemical Society, Washington, 1987.

20) Kalcher, K., Kauffmann, J. M., Wang, J., Svancara, I., Vytras, K., Neuhold, C., e Yang, Z., Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: A review with particular emphasis on the period 1990-1993, **Eletroanalysis**, 1995, **7(10)**, 5-22.

21) Scouten, W. H., Luong, J. H. T., e Brown, R. S., Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design, **TIBTECH**, 1995, **13(5)**, 178.

22) Janata, J., Josowicz, M., e Devaney, D. M., Chemical Sensors, **Anal. Chem.**, 1994, **66**, 207R.

23) *Oliveira Neto, G., e Yamanaka, H.,* Enzimas e materiais biológicos imobilizados: Biossensores, **Química Nova**, 1988, **11(5)**, 432.

24) Karube, I., e Yokoyama, K., Trends in biosensor research and development, **Sens. Actuators, B**, 1993, **B13(1-3)**, 12.

25) Eldefrawi, M. E., Eldefrawi, A . T., Rogers, K. R., e Valdes J. J., *"Pharmacological biosensor - Immunichemical assay and biosensors tecnology for the 1990s",* American Society for Microbiology, Washington, 1992.

26) Hall, E. A. H., Hall, C. E., Marttens, N., Mustan, M. N., e Data, D., *"Uses of Immobilized Biological Compounds"* (Guibault, G. G., ed), Kluwer Academic Press, 1993, pp.11.

27) Li, X. P., Fortuney, A ., Guibault, G.G., e Suleimam, A . A ., Determination of bilirubin by fibre optic biosensor , **Anal. Lett.**, 1996, **29(2)**, 171.

28) Healey, B. G., e Walt, D. R., Improved fibre-optic chemical sensor for penicilin, **Anal. Chem.**, 1995, **67(24)**, 4471.

29) Fernandes, J.R, Oliveira Neto, G. , Tubino, M. e Kubota, L., Determination of oxalate in glass by FIA with a spectrophotometric detection system using a two enzyme reactor, **Anal. Sci.**, 1996, **12(6)**, 443.

30) Wang, J., e Wu, H., Highly selective biosensing of glucose utilizing a glucose oxidase + rhotium + Nafion biocatalytic-eletrocatalytic-permselective surface microstructure, **J. Electroanal. Chem.**, 1995, 3**95(1-2)**, 287.

31) Nyamsi-Hendji, A, M., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Shul'ga, A. A., Dzydevich, S. V., Soldatkin, A. P., e El-skaya, A. V., Enzyme biosensor based on a micromachined interdigitated conductometric transducer: application to the detection of urea, glucose, acetyl and butirylcholine clorides, **Sens. Actuators, B**, 1994, **B21(2)**, 123.

32) Karube, I., Yokoyama, K., e Tamiya, E., Micro-biosensors for acetylcholine and glucose, **Biosens. Bioelectron.**, 1993, **8(3-4)**, 219.

33) Godinho, O. E. S., Rodrigues, T. C., Tubino, M., Oliveira Neto, G., e Aleixo, L. M., Immobilized enzyme flow-injection conductometric system for the determination of acetylcholine, **Anal. Proc**., 1995, **32**, 333.

34) Kano, K., Morikage, K., Uno, B., Esaka, Y., e Goto, M., Enzyme microelectrodes for choline and acetylcholine and their applications, **Anal. Chim. Acta,** 1994, **299(1)**, 69.

35) Rouillon, R., Mionetto, N., e Marty, J. L., Acetylcholine biosensor involving entrapment of two enzymes. Optimization of operational and storage of conditions, **Anal. Chim. Acta**, 1992, **268(2)**, 347.

36) Garguilo, M.G., e Michael, A.C., Enzyme-modified electrodes for peroxide, choline, and acetylcholine, **Trends Anal. Chem.**, 1995, **14(4)**, 164.

37) Navera, E. N., Sode, K., Tamiya, E., e Karube, I., Development of acetylcholine sensor using carbon fiber (amperometric determination), **Biosens. Bioelectron.**, 1991, **6(8)**, 675.

38) Shen, G., e Li, J., Biological tissue electrode for acetylcholine determination, **Yaowu-Fenxi-Zazhi**, 1991, **11(1)**, 4.

39) Loeffler, U, Wollenberger, U., Scheller, F., e Goepel, W., Amperometric biosensors for the determination of choline and acetylcholine, **Fresenius' Z., Anal. Chem.**, 1989, **335(3)**, 295.

40) Campanella, L., Sammartino, M. P., Tomassetti, M., Enzyme sensor for determination of acetylcholine and choline in rat brain extracts, **Anal. Lett.**, 1989, **22(6)**, 1389.

41) Rogers, K. R., Valdes, J. J., e Eldefrawi, M. E., Acetylcholine receptor optical-fibre evanescent fluorosensor, **Anal. Biochem.**, 1989, **182(2)**, 353.

42) Zhou, Y. K., Yuan, X. D., Hao, Q. L., e Ren, S., Development of a microbiosensor for the determination of choline and acetylcholine, **Sens. Actuators, B**, 1993, **B12(1)**, 37.

43) Stoytcheva, M., Acetylcholinesterase-based amperometric sensor, **Electroanalysis (N.Y.)**, 1995, **7(6)**, 560.

44) Campanella, L, Cocco, R., Sammartino, M. P., e Tomasseti, M., Determination of compounds with anticholinesterase activity in commercial drugs by a new enzyme sensor, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 1992, **10(10-12)**, 741.

45) Takeuchi, T., Kabasawa, Y, Horikawa, e Tanimura, T., Mechanized assay of serum cholinesterase by specific colorimetric detection of released acid, **Clin. Chim. Acta**, 1992, **205(1-2)**, 117.

46) Lopez-Garcia, I., Ruiz-Abellan, F., e Hernandez-Cordoba, M., A semi-automated flow-injection procedure for acetylcholinesterase and cholinesterase activities, **Anal. Biochem.**, 1992, **200(1)**, 176.

47) Harlin, K. S., Ross, P. F., Enzymatic-spectrophotometric method for determination of cholinesterase activity in whole blood: collaborative study, **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 1990, **73(4)**, 616.

48) Laine-Cessac, p., Turcant, A., e Allain, P., Automated determination of cholinesterase activity in plasma and erythrocytes by flow-injection analysis, and application to identify subjects sensitive to succinylcholine, **Clin. Chem.**, 1989, **35(1)**, 77.

49) Khegai, M. D., e Dobrokhotova, E. G., Potentiometric determination of blood and tissue cholinesterase activity, **Lab. Delo**, 1990, **10**, 26.

50) Imerman, P. M., pH Method for determination of cholinesterase in whole blood collaborative study, **J AOAC Int.**, 1993, **76(4)**, 899.

51) Duffy, P., e Wallach, J. M., Automated conductometric assay of human serum cholinesterase activity, **Enzyme**, 1989, **42(2)**, 98.

52) Mizutani, F., e Yabuki, S., Rapid measurement of cholinesterase activity using an amperometric enzyme electrode based on lipid-modified choline oxidase, **Anal. Sci.**, 1995, **11(1)**, 127.

53) Biosensor-Test LCW 570, *"Acetylcholinesterase Pestizid Screening"*, DDr. B. Lange GmbH, Düsseldorf, 1980, cap3.

54) Kamaric, L., e Oman, S., Semi-microtitration device for cholinesterase assay, **Anal. Biochem.**, 1989, **179(1)**, 120.

55) Carr, P. W., e Bowers, L. D., *"Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry"*, Wiley, New York, 1980.

56) Stein, e Schwedt, G., Comparison of immobilization methods for the development of an acetylcholinesterase biosensor, **Anal. Chim. Acta**, 1993, **272**, 73.

57) Sherma, J., *Pesticides*, **Anal. Chem.**, 1995, **67**, 1R, e referências citadas.

58) Sherma, J., *Pesticides*, **Anal. Chem.**, 1993, **65**, 40R, e referências citadas.

59) Barceló, D., Ocorrence, handling and chromatographic determination of pesticides in aquatic environment, **Analyst**, 1991, **116**, 681.

60) Trojanowicz, M., e Hitchaman, M. L., Simple disposable potentiometric biosensor for pesticides, **Chem. Anal. (Warsaw)**, 1995, **40(4)**, 609.

61) Kauffman, J. M., e Guilbault, G. G., *"Potentiometric enzyme electrodes - Biosensor Principles and Applications"*, Marcel Dekker; New York, 1991.

62) Nyamsi-Hendji, A. M., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Clechet, P., Shul'ga, A. A., Strikha, V. I., Netchiporuk, L. I., Soldatkin, A. P., e Woldarski, W. B., Sensitive detection of pesticides using a differential ISFET-based system with immobilized cholinesterases, **Anal. Chim. Acta,** 1993, **281(1)**, 3.

63) Dumschat, C., Mueller, H., Stein, K., Schwedt, G., Pesticide-sensitive ISFET based on enzyme inhibition, **Anal. Chim. Acta**, 1991, **252(1-2)**, 7-9.

64) Kumaram, S., Meier, H., Danna, A. M., e Tran-Minh, C., Immobilization of thin enzyme membranes to construct glass enzyme electrodes, **Anal. Chem.**, 1991, **63(18)**, 1914.

65) Schasfoort, R. B. M., Niedziela, T., Detection of inhibitory compounds of acetylcholinesterase with a novel ion-responding impedance sensor (IRIS), **Sens. Actuators, B.**, 1994, **B18(1-30)**, 175.

66) Kumaran, S., e Morita, M., Application of a cholinesterase biosensor to screen for organophosphorus pesticides extracted from soil, **Talanta**, 1995, **42(4)**, 649.

67) Kumaram, S., e Tran-Minh, C., Insecticide determination with enzyme electrodes using different enzyme immobilization techniques, **Electroanalysis**, 1992, **4(10)**, 949.

68) Marty, J. L., Sode, K., e Karube, I., Biosensor for detection of organophosphate and carbamate insecticides, **Eletroanalysis**, 1992, **4( )**, 249.

69) La-Rose, C., Pariente, F., Hernandez, L., e Lorenzo; E., Amperometric flow-through biosensor for the determination of pesticides, **Anal. Chim. Acta**, 1995, **308(13)**, 129.

70) Günther, A., e Bilitewski, U., Characterization of inibitors of acetylcholinesterase by an automated amperometric flow-injection system, **Anal. Chim. Acta**, 1995, **300(1-3)**, 117.

71) Skladal, P., Pavlik, M., e Fiala, M., Pesticide biosensor based on co-immobilized acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, **Anal. Lett.**, 1994, **27(1)**, 29.

72) Hartley, I. C., Hart, J. P., Amperometric measurement of organophosphate pesticides using a screen-printed disposable sensor and biosensor based on cobalt phthalocyanine, **Anal. Proc. (London)**, 1994, **31(11)**, 333.

73) La-Rose, C., Pariente, F., Hernandez, L., Lorenzo, e E., Determination of organophosphorus and carbamic pesticides with an acetylcholinesterase amperometric biosensor using 4-aminophenyl acetate as substrate, **Anal. Chim. Acta**, 1994, **295(3)**, 273.

74) Martorell, D., Cespedes, F., Martínez-Fàbregas, E., e Alegret, S., Amperometric determination of pesticides using a biosensor based on a polishable graphite-epoxy biocomposite, **Anal. Chim. Acta**, 1994, **290(3)**, 343.

75) Günther, A., e Bilitewski, U., Characterization of inibitors of acetylcholinesterase by an automated amperometric flow-injection system, **Anal. Chim. Acta**, 1995, **300(1-3)**, 117.

76) Skladal, P., Pavlik, M., e Fiala, M., Pesticide biosensor based on co-immobilized acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, **Anal. Lett.**, 1994, **27(1)**, 29.

77) Botre, F., Lorenti, G., Mazzei, F., Simonetti, G., Porcelli, F., Botre, C., e Scibone, G., Cholinesterase-based bioreactor for determination of pesticides, **Sens. Actuators, B,** 1994, **19(1-3)**, 689.

78) Skladal, P., Macholan, L., Petrivalsky, M., Pluhacek, I., e Stancic, L., Sensing of insecticides using amperometric enzyme biosensors, **GIT-Fachz. Lab.**, 1993, **37(7)**, 606.

79) Skladal, P., Detection of organophosphate and carbamate pesticides using disposable biosensors based on chemically modified electrodes and immobilized cholinesterase, **Anal. Chim. Acta,** 1992, **269(2)**, 287.

80) Skladal, P., e Mascini, M., Sensitive detection of pesticides using amperometric sensors based on cobalt phthalocyanine-modified composite electrodes and immobilized cholinesterases, **Biosens. Bioelectron.**, 1992, **7(5)**, 335.

81) Rouillon, R., Monetto, N., e Marty, J. L., Acetylcholine biosensor involving entrapment of 2 enzymes - Optimization of operational and storage conditions, **Anal. Chim. Acta**, 1992, **268(2)**, 347.

82) Campanella, L, Cocco, R., Sammartino, M. P., e Tomasseti, M., A new enzyme-inhibition sensor for organophosphorus pesticides analysis, **Sci. Total Environm.**, 1992, **123(8)**, 1.

83) Skladal, P., Determination of organophosphate and carbamate pesticides using a cobalt phthalocyanine-modified carbon paste electrode, **Anal. Chim. Acta**, 1991, **252(1-2)**, 11.

84) Wollenberger, U., Setz, K., Sheller, F. W., Loeffer, U., Goepel, W., e Gruss, R., Biosensors for choline, choline esters and choline esterases inhibitors, **Sens. Actuators**, **B**, 1991, **B4(3-4)**, 257.

85) Kulys, J., Costa, E. J. D., Printed amperometric sensor based on TCNQ [7,7,8,8-tetracyanoquinodinodimethane] and cholinesterase, **Biosens. Bioelectron.**, 1991, **6(2)**, 109.

86) Herzsprung, P., Weil, L., Quentin, K. E., e Zombola, I., Determination of organophosphorus compounds and carbamates by their inhibition of cholinesterase. II. Estimation of detection limits for insecticide determination by concentration, oxidation and inhibition values, **Vom-Wasser**, 1990, **74(4)**, 339.

87) Bernabei, M., Cremisini, C., Mascini, M., e Palleschi, G., Determination of organophosphorus and carbamic pesticides with a choline and acetylcholine electrochemical biosensor, **Anal. Lett.**, 1991, **24(8)**, 1317.

88) Hernandez-Mendez, J., Carabias-Martinez, R., Rodrigues-Gonzalo, E., e Perez-Trancon, J., Determination of parathion in the presence of paraoxon and 4-nitrophenol by flow-injection analysis with amperometric detection, **Anal. Chim. Acta**, 1990, **228(2)**, 317.

89) Rodrigues, T. C., Tubino, M., Godinho, O .E.S., e Oliveira Neto, G., An immobilized acetylcholinesterase flow-injection conductimetric system for the determination of paraoxon, **Anal. Sci.**, 1997, **13(6)**, 1.

90) Dzyadevich, S. V., Soldatkin, A. P., Shu'ga, A. A., Strikha, V. I., e El'skaya, A. V., Condutometric biosensor for determination of organophosphorus pesticides, **Zh. Anal. Khim.**, 1994, **49(8)**, 874.

91) Dzyadevich, S. V., Shul'ga, A. A., Soldatkin, A. P, Nyamsi-Hendji, A. M., Jaffrezic-Renault, N.; e Martelet, C., Conductometric biosensors based on cholinesterases for sensitive detection pesticides, **Electroanalysis**, 1994, **6(9)**, 752.

92) Guillemin, M. T., Wallach, J., e Hanss, M., Conductometric measurement of cholinesterase inhibition by some pesticides, **Anal. Lett.**, 1982, **15(B4)**, 385.

93) Duffy, P., Saad, I., e Wallach, J. M., New developments of conductometry measurements in analytical biochemistry, **Anal. Chim. Acta**, 1988, **213 (1-2)**, 267.

94) Harlin, K. S., e Ross, P. F., Enzimatic-spectrofotometric method for determinattion of cholinesterase activity in wole blood: collaborative study, **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 1990, **73(4)**, 616.

95) León-gonzales, M. E., e Townshend, A., Flow-injection determination of paraoxon by inhibition of immobilized acetylcholinesterase, **Anal. Chim. Acta**, 1990, **236(6)**, 267.

96) Dayananda, S., Nandakumar, N. V., Colorimetric enzymic determination of methyl parathion [parathion-methyl] and paraoxon, **Chim. Acta Turc.**, 1987, **15(3)**, 485.

97) Trettnark, W., Reininger, F., Zinterl, E., e Wolfbeis, O. S., Fibre-optic remote detection of pesticides and related inhibitors of the enzyme acetylcholine esterase, **Sensors and Actuators, B**, 1993, **11(1-3)**, 87.

98) Aizawa, M., Principles and applications of electrochemical and optical biosensor, **Anal. Chim. Acta**, 1991, **250(1)**, 249.

99) van der Linden, W. E., Membrane separation in flow injection analysis, **Anal. Chim. Acta**, 1983, **151(3)**, 359.

100) Tubino, M., e Barros, F. G., Conductometric and colorimetric determination of volatile acidity of vinegars by flow injection analysis, **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 1991, **74(10)**, 346.

101) Barros, F. G., e Tubino, M., Conductometric and spectrophotometric determination of the volatile acidity of wines by flow injection, **Analyst,** 1992, **117(5),** 917.

102) Tubino, M., A conductimetric detector for flow injection analysis, **J. Flow Injection Anal.**, 1994, **11(1)**, 94.

103) Tubino, M., e Barros, F. G., Uma válvula introdutora de amostra para análise por injeção em fluxo, **Quim. Nova**, 1991, **14(1)**, 49.

104) Kubota, L.; *Síntese*, Caracterização e algumas propriedades do óxido de titânio (IV) enxertado sobre superfície de sílica, **Tese de Doutorado**, UNICAMP, 1993.

105) Neto, G. O., **Analyst**, 1991, **116(5)**, 357.

106) Pasquini, C., e Faria, L. C., Flow-injection determination of ammonia in Kjeldahl digests by gas diffusion and conductometry, **Anal. Chim. Acta**, 1987, **193(3)**, 19.