

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

**“UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE
IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA OXALATO OXIDASE
NA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES”**

SAYURI OKAMOTO

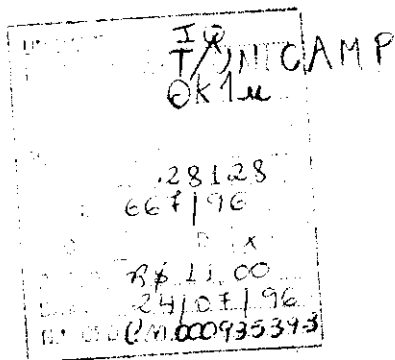
**ORIENTADOR: Prof. Dr. GRACILIANO
DE OLIVEIRA NETO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO



JUNHO/ 1996





Okamoto, Sayuri

Utilização de diferentes tipos
de imobilização da enzima oxa-
lato oxidase na construção de
T/UNICAMP/Oklu
DEVOLVER NOME LEIT. (28128/96)

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

Okamoto, Sayuri
Oklu Utilização de diferentes tipos de imobilização da enzima
oxalato oxidase na construção de biossensores / Sayuri
Okamoto. -- Campinas, [SP : s.n], 1996.

Orientador: Graciliano de Oliveira Neto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Cam-
pinas. Instituto de Química.

1. Imobilização enzimática. 2. Oxalato oxidase. 3.
Biossensores. I. Oliveira Neto, Graciliano. II. Universida-
de Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Comissão Examinadora

Presidente: Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto
Instituto de Química - UNICAMP

Membros: Prof. Dr. Lúcio Angnes
Instituto de Química - USP-SP

Prof^a. Dra. Solange Cadore
Instituto de Química - UNICAMP

Suplentes: Prof. Dr. José Fernando de Andrade
FFCLRP - USP

Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota
Instituto de Química - UNICAMP

AGRADECIMENTOS

- Ao prof. Dr. Graciliano pela amizade, compreensão e orientações valiosas.
- À Prof^ª Dr^ª Isabel S. F. Jardim pela amizade, cooperação e ajuda na parte de radiação gama.
- Ao Prof. Dr. Lauro Kubota pela ajuda e conhecimentos na parte de eletrodos amperométricos
- A Capes pela ajuda financeira.
- À IBRAS-CBO pela irradiação das amostras.
- À Luciane pelos auxílios prestados ao longo deste trabalho
- Ao Joãozinho pelo lacramento das ampolas.
- Aos colegas de laboratório e professores pela convivência diária, em especial ao Carlos, Laércio, João, Pilar, Cristina, prof. Wallace e prof. Godinho pela ajuda e paciência na confecção desta dissertação.
- À Márcia, Alessandra, Silvia, Andréa, Lucília , Adriana , Luciana e Sibov pela convivência diária.

CURRÍCULO

1. IDENTIFICAÇÃO

NOME: Sayuri Okamoto

NATURALIDADE: Tóquio-to - Japão

NACIONALIDADE: Japonesa

NASCIMENTO: 12/ 07/ 69

FILIAÇÃO: Hisajiro Okamoto e Yukiko Okamoto

RNE: W237779-H

ÓRGÃO EMISSOR: SE/DPMF

DATA DE EMISSÃO: 20/08/87

PASSAPORTE: nº 0677330

CLASSIFICAÇÃO: permanente

CIC: 188081688-16

2. ESCOLARIDADE

1^o GRAU: E.E.P.G. “Dr. Vicente Zammite Mammana”

Rua Oscarito, 25 Vila Planalto

São Bernardo do Campo-SP Período: 1977 a 1984

2^o GRAU: Escola Técnica Estadual “Lauro Gomes”

Av. Pereira Barreto, 400 Centro

São Bernardo do Campo-SP Período: 1985 a 1988

Curso: Técnico Laboratorista Industrial

3^o GRAU: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”

Campinas-SP Período: 1989 a 1993

Modalidade: Bacharelado em Química

3. CURSOS

Curso: Introdução à espectroscopia de massa

X Encontro Nacional dos Estudantes de Química

Universidade Federal de Brasília - UnB período: 04 a 11/01/91

Curso: Modified Electrodes: principles, elaboration and applications

VIII Encontro Nacional de Química Analítica

Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG período: 3 a 6/ 09/95

4. INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Título: Desenvolvimento de Blendas Poliméricas

departamento: Físico-Química

duração: 1 ano bolsa: CNPq (6 meses)

5. PUBLICAÇÕES

“Construção de um sistema FIA e seu emprego na investigação da enzima oxalato oxidase naturalmente imobilizada na folha de *Amarantus spinosus* (caruru)”

Sayuri Okamoto; Graciliano de Oliveira Neto; Lauro T. Kubota; Luiz M. Aleixo e Oswaldo E.S. Godinho.

18^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ Caxambú

Período: 30/05 a 02/06/95 - Livro de Resumos/ QA-048

“Construção e biossensor para oxalato utilizando sílica gel funcionalizada e azul de metileno como mediador”

Sayuri Okamoto; Graciliano de Oliveira Neto; Lauro Tatsuo Kubota, Oswaldo Espírito Santo Godinho e Luiz Manoel Aleixo.

VIII Encontro Nacional de Química Analítica - UFMG

Período: 03 a 06/09/95 - Livro de Resumos/ p.48.

Aos meus pais pela educação,
criação e existência, dedico esta
dissertação

Ao Prof. Graciliano, meu pai científico
pela amizade e por ter me
ensinado lições
valiosas.

A Tartaruga de um olho e o tronco flutuante de Sândalo

.....No leito do oceano, a oitenta mil *yojana* de profundidade, vive uma tartaruga. Ela não tem membros nem nadadeiras. Seu ventre é quente como ferro em brasa, e o dorso de seu casco é gelado como as montanhas nevadas. O que essa tartaruga anseia dia e noite, da manhã ao anoitecer é esfriar seu ventre e aquecer o dorso do seu casco.

O pé de sândalo vermelho é considerado sagrado e comparado a um sábio entre as outras pessoas.....A madeira desse pé de sândalo tem o poder de resfriar o ventre da tartaruga. A tartaruga deseja por todos os meios subir no tronco de sândalo e colocar seu ventre na abertura do mesmo para resfriá-la, e ao mesmo tempo expor o dorso ao sol para aquecê-lo.....Mesmo quando, vencendo todas as adversidades, a tartaruga encontrar um tronco flutuante de sândalo com uma abertura do tamanho adequado, por ela ter um só olho, a visão é distorcida. Assim, quanto mais apressadamente ela nada para subir no tronco, mais se afasta dele.....

Nitiren Daishonin
26 de março de 1279

Índice

página

RESUMO ----- i

ABSTRACT ----- ii

CAPÍTULO I : APRESENTAÇÃO E OBJETIVO ----- 001

PARTE A : INTRODUÇÃO

CAPÍTULO II : OXALATO

II.1 - Generalidades ----- 002

II.2 - Métodos para determinação de oxalato----- 003

II.2.1 - Método Colorimétrico ----- 004

II.2.2 - Método de Diluição Isotópica ----- 004

II.2.3 - Método Cromatográfico de Troca Iônica ----- 005

II.2.4 - Método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)- 005

II.2.5 - Método da Cromatografia Gasosa ----- 006

II.2.6 - Método Enzimático ----- 006

II.2.6.1 - Método Colorimétrico ----- 007

II.2.6.2 - Método Cromatográfico ----- 008

II.2.6.3 - Método Calorimétrico ----- 008

II.2.6.4 - Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA)----- 009

II.2.6.5 - Método Potenciométrico ----- 009

II.2.6.6 - Método Amperométrico ----- 009

CAPÍTULO III : ENZIMAS

III.1 - Generalidades ----- 010

III.2 - Cinética Enzimática----- 013

III.3 - Efeito do pH na atividade enzimática----- 018

III.4 - Efeito da temperatura nas reações enzimáticas----- 019

CAPÍTULO IV : IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

IV.1 - Generalidades -----	020
IV.2 - Imobilização em tecidos vegetais -----	021
IV.3 - Imobilização por método da ligação cruzada intermolecular-----	021
IV.4 - Imobilização por método de suporte com ligação covalente-----	024
IV.5 - Imobilização por método de ligação química com o suporte utilizando reagentes polifuncionais-----	024
IV.6 - Imobilização por método da oclusão -----	024
IV.7 - Imobilização via radiação gama -----	025
IV.7.1 - Generalidades-----	025
IV.7.2 - Efeito da radiação em polímeros-----	027
IV.7.3 - Imobilização enzimática via radiação gama-----	027

CAPÍTULO V : BIOSSENSORES

V.1 - Generalidades -----	028
V.2 - Biossensores Potenciométricos-----	029
V.3 - Biossensores Amperométricos-----	029
V.3.1 - Mediadores Eletrônicos -----	030
V.3.2 - Reator Enzimático -----	032

CAPÍTULO VI : OXALATO OXIDASE

VI.1 - Características Gerais -----	033
VI.2 - Ativadores e inibidores da oxalato oxidase -----	034

PARTE B : PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO VII : REAGENTES E APARELHAGEM

VII.1 - Reagentes Utilizados -----	035
VII.2 - Aparelhagem utilizada -----	036

CAPÍTULO VIII : TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO

VIII.1 - Imobilização enzimática -----	037
VIII.1.1 - Imobilização em tecidos vegetais-----	037
VIII.1.2 - Imobilização por método de suporte com ligação covalente -----	038
VIII.1.3 - Imobilização por método da ligação química com suporte utilizando reagentes polifuncionais-----	039
VIII.1.4 - Imobilização via radiação gama -----	039
VIII.1.5 - Imobilização por método da oclusão-----	041
VIII.2 - Imobilização dos mediadores -----	041
VIII.2.1 - Azul de metileno imobilizado em sílica gel funcionalizada com óxido de titânio -----	041
VIII.2.2 - Azul de meldola em sílica funcionalizada com óxido de titânio-fosfato-----	042

CAPÍTULO IX : CONSTRUÇÃO DOS BIOSSENSORES

IX.1 - Biossensor potenciométrico-----	043
IX.1.1 - Transdutor potenciométrico -----	044
IX.2 - Biossensor amperométrico -----	045
IX.2.1 - Transdutor amperométrico-----	046
IX.3 - Reatores Enzimáticos -----	047
IX.3.1 - Reator Enzimático com detecção amperométrico -----	047
IX.3.2 - Reator Enzimático com detecção potenciométrica-----	048

CAPÍTULO X : CÉLULAS UTILIZADAS

X.1 - Células utilizadas com biossensor potenciométrico -----	049
X.2 - Célula utilizada com biossensor amperométrico-----	052
X.3 - Célula amperométrica utilizando reator enzimático -----	053
X.4 - Célula utilizada com reator enzimático com detecção potenciométrica -----	054

CAPÍTULO XI : METODOLOGIAS ANALÍTICAS

XI.1 - Determinação Potenciométrica -----	055
XI.1.1 - Escolha do material para suporte -----	055
XI.1.2 - Escolha do pH de trabalho-----	056
XI.1.3 - Estudo do efeito da temperatura e da concentração do eletrólito interno -----	057
XI.2 - Determinação Amperométrica-----	057
XI.2.1 - Estudos eletroquímicos -----	057
XI.2.2 - Análise por injeção em fluxo -----	058

PARTE C : RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO XII : EFEITO DAS DIFERENTES IMOBILIZAÇÕES DA ENZIMA NO BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO

XII.1 - Escolha da célula utilizada -----	059
XII.2 - Escolha do material para suporte-----	061
XII.3 - Escolha da enzima comercialmente disponível -----	063
XII.4 - pH da solução tampão -----	065
XII.5 - Tampão Utilizado-----	068
XII.6 - Estudo do efeito da temperatura-----	071
XII.7 - Estudo dos efeitos e melhores condições para imobilização via radiação gama -----	075

CAPÍTULO XIII : IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA POR OCLUSÃO NA PASTA DE CARBONO NO BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO UTILIZANDO MEDIADORES ELETRÔNICOS

XIII.1 - Influência dos mediadores utilizados -----	088
XIII.2 - Influência da velocidade de varredura-----	095
XIII.3 - Influência da concentração das soluções de eletrólito suporte sobre os mediadores-----	100
XIII.4 - Influência de alguns cátions e de alguns ânions-----	103
XIII.5 - Influência dos tampões usados como eletrólito suporte sobre os mediadores -----	107
XIII.6 - Estudo da influência do pH-----	110
XIII.7 - Curvas de calibração -----	112
XIII.8 - Reatores Amperométricos-----	115

PARTE D : CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

CAPÍTULO XIV : CONCLUSÃO -----	120
---------------------------------------	------------

CAPÍTULO XV : PERSPECTIVAS FUTURAS -----	122
---	------------

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	123
---	------------

RESUMO

Título: “Utilização de diferentes tipos de imobilização da enzima oxalato oxidase na construção de biossensores.”

Autora: Sayuri Okamoto

Orientador: Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto

palavras-chave: imobilização enzimática, oxalato oxidase, biossensores

Este trabalho consiste no desenvolvimento de biossensores potenciométricos e amperométricos para análise de oxalato. A enzima utilizada foi a oxalato oxidase que foi imobilizada utilizando diferentes técnicas de imobilização enzimática. Talos de beterraba foram utilizadas como suporte para alguns dos métodos de imobilização (radiação gama, ligação covalente, adsorção e natural), com os quais, construiu-se biossensores potenciométricos. As enzimas purificadas foram imobilizadas por oclusão, em uma matriz de pasta de carbono, constituindo biossensores amperométricos. Construiu-se um reator enzimático, com detecção amperométrica, tendo como fonte enzimática, as folhas de caruru.

A imobilização feita com radiação gama resultou em maior tempo de vida e quando associada com glutaraldeído, conferia maior estabilidade ao processo de imobilização. Provavelmente, a irradiação auxilia no processo de formação de ligações covalentes, tornando-as mais efetivas. O ambiente de oxigênio inibe a formação destas ligações covalentes. Enquanto na presença de tampão, a atividade enzimática é inibida. Os biossensores amperométricos, apresentaram uma faixa útil de 1×10^{-5} a 1×10^{-4} mol/L de ácido oxálico com facilidades de preparo e manuseio. O emprego dos mediadores poderiam ser eficazes para eliminação de interferências por espécies eletroativas detectáveis em potenciais mais altos. Pelo estudo em sistema FIA com reator enzimático, determinou-se um valor de K_m de $1,3 \times 10^{-2}$ mol/L para a enzima “*in natura*” em folhas de caruru e foi utilizado para análise de ácido oxálico na faixa de $2,5 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L.

Abstract

key-words: enzyme immobilization, oxalate oxidase, biosensors

This work is based on development of potentiometric and amperometric biosensors in order to analyse oxalate. Several technics of enzyme immobilization were used to immobilize oxalate oxidase on beet stem which were used as enzyme suport and submitted to differents kinds of immobilization (gamma radiation, covalent linkage, adsorption and natural) making potentiometric biosensor. The purified enzyme was immobilized by occlusion in the carbon paste to obtain an amperometric biosensor. An enzyme reactor with amperometric detection was made using spiny pigweed as enzyme source.

The immobilization by gamma irradiation gave more enzyme lifetime and when it is associated with glutaraldehyde provided more stability to immobilization process. Probably, the gamma irradiation helps in the process of covalent linkage formation, making then more effective. The oxygen ambient inhibits the formation of these linkages while in the presence of buffer, the enzyme activity is inhibited. The amperometric biosensors, showed usefull working range of 1×10^{-5} - 1×10^{-4} mol/L for oxalic acid, which are easy to prepare and to handle. The use of mediators could be efficient to eliminate electroactives interferences which is detectable in higher potentials. By studies performed with a enzyme reactor acopled to a FIA system, the K_m value for the natural spiny pigweed enzyme was found to be 1.3×10^{-2} mol/L and the usefull range for oxalic acid determination was $2,5 \times 10^{-3}$ - $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L.

Capítulo I

Apresentação e objetivo

Um dos grandes avanços obtidos no desenvolvimento dos biossensores provêm principalmente, das diferentes técnicas de imobilização enzimática que permitem a reutilização do material biológico ativo.

Devido a problemas clínicos como, cálculos renais, anúria, entre outros, o interesse em analisar níveis de oxalato presente em amostras biológicas, como urina e sangue, ou amostras alimentícias como chocolate, espinafre, suco de laranja vem crescendo ultimamente.

O objetivo deste trabalho foi utilizar a enzima oxalato oxidase (EC 1.2.3.4) nas formas “*in natura*” contidas em diversas fontes vegetais e na forma purificada para construção de biossensores e comparar as diferentes técnicas de imobilização envolvendo ligações covalentes via glutaraldeído, radiação gama com Co-60 como fonte emissora, e oclusão em pasta de carbono.

Este trabalho se apresenta em quatro partes, sendo parte A (capítulos I a VI) a introdução, parte B (capítulos VII a XI) a parte experimental, parte C (capítulos XII e XIII) resultados e discussão e parte D (capítulos XIV e XV) conclusão e perspectivas futuras. A parte A abrange todo fundamento teórico da metodologia, analito e enzima utilizada; a parte B descreve todo procedimento e aparelhagem utilizados e a parte C, mostra e discute todos os resultados obtidos.

Parte A

Introdução

Capítulo II

Oxalato

II.1 - Generalidades⁽¹⁾

Oxalato está presente em várias plantas, sendo encontrado em maior concentração no espinafre, azedinha, folhas de ruibarbo e, em menores concentrações, nas vegetações como alfafa, grama, capim, vegetais como a beterraba e sucos como os de laranja e de oxicoco (uva-do-monte). Também é um produto do metabolismo de alguns bolores e de algumas espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, que convertem açúcar em oxalato de cálcio. Pode ser produzido metabolicamente, sendo o co-produto do processo de fermentação do melaço à ácido cítrico.

Os cristais ou soluções de oxalato também são utilizadas para prevenir a coagulação do sangue em análises químicas.

O ácido oxálico reage com um grande número de cátions formando sais solúveis e insolúveis. Os oxalatos de alumínio, cálcio, cobalto, cobre, níquel e chumbo são insolúveis em água, enquanto que os oxalatos de amônio, bário, crômio, ferro, magnésio, manganês, potássio, prata, sódio, estrôncio e zinco são considerados solúveis.

O ácido oxálico é considerado altamente tóxico sob qualquer forma de exposição. A sua ingestão em alta concentração tem efeito purgativo e pode causar vômitos, irritação gastrointestinal, dores de garganta, de esôfago e de estômago, depressão, pulsação irregular, hipotensão, colapso cardiovascular, problema nos rins, dor de cabeça, espasmos musculares, fraqueza, coma e até mesmo a morte. A dose letal para o ser humano adulto é de 15 a 30g, embora já tenham sido encontradas vítimas fatais pela ingestão de 5 g. A quantidade de 250 mg de oxalato de sódio é considerada um excesso no organismo, resultando em um aumento da concentração de oxalato excretado pela urina.

O efeito mais comumente encontrado após a exposição crônica à baixas doses de oxalato é o dano causado ao rim, pois este órgão é o alvo

primário seguido pelo sistema nervoso. Este dano é induzido pela formação de cristais de oxalato de cálcio, insolúveis, cujos efeitos podem se manifestar dois dias após a ingestão. As doenças relacionadas com os rins resultam da precipitação destes cristais nos tubos deste órgão conduzindo aos sintomas de oligúria (pequena quantidade de urina), anúria (interrupção da formação de urina), albuminúria (proteína na urina) e hematuria (sangue na urina). A exposição crônica à baixas doses está associada com a produção de pedras nos rins ou cálculo renal.

A formação de oxalato de cálcio diminui a quantidade de cálcio disponível nos fluidos humanos, resultando na hipocalcemia, que influe na atividade eletro-cardiovascular do coração, músculos e nervos. O ácido oxálico absorvido na forma solúvel é excretado na urina não havendo evidência que o oxalato seja utilizado ou metabolizado pelos tecidos humanos. A média de excreção de oxalato pelo homem é de 0,2 a 0,5 mg/kg por peso do corpo.

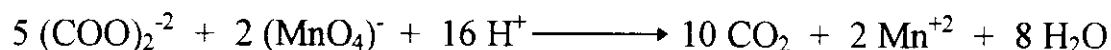
O ácido ascórbico, amplamente ingerido na forma de vitamina C, é metabolizado a oxalato de cálcio, sendo que sua ingestão, em grande quantidade, pode resultar no desenvolvimento de doenças renais crônicas, devido à produção e retenção de cristais de oxalato de cálcio nos tubos renais. A maior parte do oxalato encontrado na urina é derivada do metabolismo do ácido ascórbico (35-44%) ou da glicina (40%). O restante, provavelmente, provem de fontes metabólicas menores ou diretamente da dieta alimentar.

II.2 - Métodos para determinação de oxalato

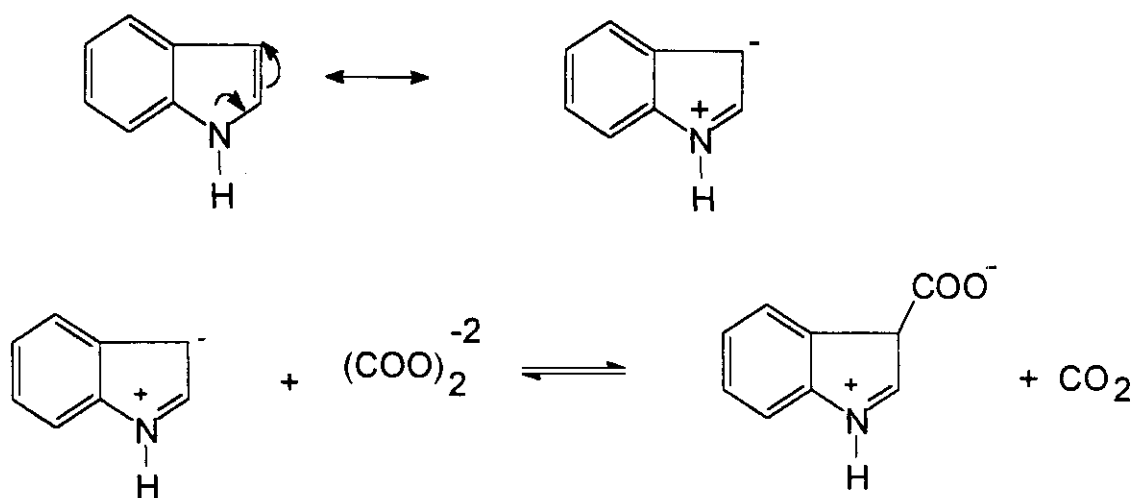
Várias técnicas são utilizadas para determinação de oxalato, tais como: colorimetria, diluição isotópica, cromatografia de troca iônica, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa e métodos enzimáticos⁽²⁾.

II.2.1 - Método Colorimétrico⁽³⁾

Este método consiste em reagir o oxalato com permanganato de potássio segundo a reação química:



Como o método permanganométrico não fornece resultados muito precisos, pois é uma técnica difícil de se visualizar o ponto final de titulação devido a presença de dióxido de manganês, substitui-se o permanganato de potássio por indol que reage segundo a equação química descrita a seguir:



II.2.2 - Método de Diluição Isotópica⁽³⁾

Hockaday et al., em 1965, adicionaram ácido oxálico com carbono marcado C^{14} à amostra, precipitando o oxalato na forma de sal de cálcio. O precipitado foi então reduzido a glicolato, por zinco, em meio de ácido

sulfúrico e colocado em uma coluna de Dowex-1-(X8)-acetato. O glicolato foi então determinado posteriormente, através da reação com 2,7-diidroxinaftaleno.

II.2.3 - Método Cromatográfico de Troca Iônica⁽⁴⁾

Manon e Mahle⁽⁵⁾, injetaram amostras de oxalato em um cromatógrafo a líquido com coluna de troca iônica e verificaram que as espécies catiônicas não são retidas pela coluna, enquanto as espécies aniônicas interagem mais com a fase estacionária e são eluídas com tampão de carbonato de potássio. Os íons potássio são removidos e o oxalato, na forma livre, é detectado pela sua condutividade.

II.2.4 - Método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

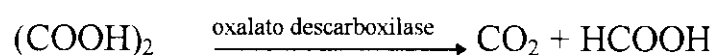
Um pré-tratamento da amostra foi efetuado, utilizando solução de NH_3 concentrada e ajustou-se o pH a 6, com posterior precipitação do oxalato utilizando-se para isto solução de CaCl_2 . As amostras foram dissolvidas em um solução de HCl 0,5 mol/L e neutralizada com adição de solução de NH_3 3 mol/L para prolongar a vida útil da coluna. Esta amostra foi centrifugada e seu sobrenadante foi injetada na coluna “Waters Corasil II” acoplada a um cromatógrafo a líquido. A fase móvel utilizado foi o tampão fosfato pH=2⁽⁴⁾. Alternativamente, a detecção pode ser feita por quimiluminescência empregando-se o tris(2,2'-bipiridil)rutênio(II) eletrogerado. Utilizando o mesmo método, o oxalato também pode ser separado em uma coluna de fase-reversa (Zorbax ODS) usando-se uma fase móvel constituída de 10% metanol em tampão fosfato 100 mmol/L a pH7,0. O composto eluído é combinado com o fluxo de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ 2 mmol/L antes de passar pela célula de fluxo quimiluminescente.⁽⁶⁾

II.2.5 - Método da Cromatografia Gasosa⁽⁴⁾

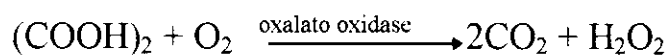
As amostras de oxalato foram precipitadas em sulfato de cálcio e então convertidas à dimetiloxalato, que foi analisado através de um cromatógrafo a gás conforme descrito por Park e Gregory⁽⁷⁾.

II.2.6 - Método Enzimático⁽⁸⁾

Os métodos de determinações enzimáticas são baseados na utilização da enzima oxalato descarboxilase (EC 4.1.1.2), que catalisa a reação:

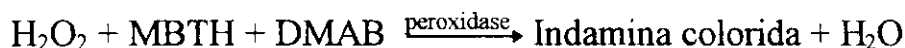
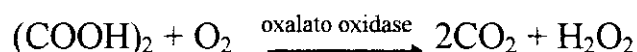


ou, no uso da enzima oxalato oxidase (EC1.2.3.4) que catalisa a seguinte reação:

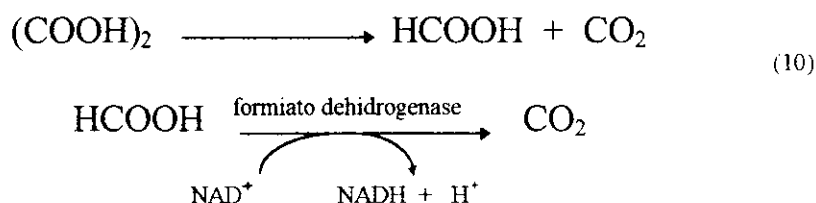


II.2.6.1 - *Método Colorimétrico*

Utilizando a oxalato oxidase (EC1.2.3.4), o oxalato é oxidado a peróxido de hidrogênio e dióxido de carbono. O peróxido de hidrogênio reage com 3-metil-2-benzolinona hidrazona (MBTH) e ácido 3-dimetilaminobenzóico (DMAB) na presença da enzima peroxidase (EC1.11.1.7), medindo-se a absorvância a 590nm⁽⁹⁾.



Com a enzima oxalato descarboxilase (EC 4.1.1.2), utiliza-se a enzima formiato deidrogenase, que requer um cofator NAD^+ (adenina dinucleotida nicotinamida)⁽⁸⁾, medindo-se a absorvância de NADH a 340 nm.



A desvantagem deste método reside na utilização de grande quantidade de enzima.

II.2.6.2 - Método Cromatográfico⁽¹¹⁾

As amostras contendo oxalato como a urina por exemplo, são ajustadas entre pH=5,0 - 5,5 pela adição de solução de NaOH 1 mol/L ou HCl 1 mol/L conforme necessário, e injetadas no cromatógrafo a líquido e separadas em uma coluna PBE94 (“polybuffer exchanger”). Usa-se como fase móvel solução tampão fosfato 0,05 mol/L pH=5,5 contendo 154 µmol/L de azoteto de sódio, cuja fração coletada é descartada. Utiliza-se como nova fase móvel o tampão fosfato 0,3 mol/L, pH=5,5, com 154 µmol/L de azoteto de sódio em cuja fração está o oxalato a ser analisado. Este oxalato é então, determinado pelo método colorimétrico descrito no subitem II.2.6.1.

II.2.6.3 - Método Calorimétrico⁽¹²⁾

O termistor enzimático (ET) consiste de um bloco de alumínio termostatizado ao redor de uma coluna com matriz de enzima imobilizada, no qual se bombeia continuamente o tampão. Estas reações enzimáticas estão associadas com considerável variação de entalpia. Para a análise de oxalato, imobiliza-se a enzima oxalato oxidase na superfície de vidro de porosidade controlada. Utiliza-se o tampão citrato 0,1 mol/L, pH=3,5, contendo 0,8 mmol/L de 8-hidroxiquinolina e 2 mmol/L de EDTA, bombeado num fluxo contínuo de 0,6 mL/min.

II.2.6.4 - Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA)⁽¹³⁾

Este sistema utiliza um reator enzimático que contém a enzima oxalato oxidase imobilizada. O peróxido de hidrogênio formado, é então detectado por quimiluminescência via reação com luminol e hexacianoferrato(III), ou então utilizando-se o método colorimétrico.

II.2.6.5 - Método Potenciométrico⁽¹⁴⁾

Este método baseia-se em prender fisicamente a enzima na superfície de um eletrodo de gás sensível a CO₂. A enzima utilizada pode ser a oxalato oxidase assim como a oxalato descarboxilase.

II.2.6.6 - Método Amperométrico⁽¹⁴⁾

Neste método, a enzima oxalato oxidase é fisicamente imobilizada na superfície de um sensor para detecção do peróxido de hidrogênio ou, de um eletrodo de gás sensível ao Oxigênio, detectando a produção de peróxido de hidrogênio ou o consumo de oxigênio na reação.

Capítulo III

Enzimas

III.1 - Generalidades

A maioria das enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas.⁽¹⁵⁾ Elas possuem um alto grau de especificidade com respeito aos substratos (reagentes) e seus produtos.⁽¹⁶⁾ Propriedades como a flexibilidade da molécula e massa molecular variada são muito importantes. Elas requerem manuseio e estocagem adequadas, pois estes fatores delimitam sua atividade e estabilidade⁽¹⁷⁾.

A nomenclatura das enzimas é usualmente acrescida do sufixo *-ase* ao nome do substrato da enzima ou da fase descritiva da ação da catálise enzimática. Elas são classificadas e nomeadas de acordo com a natureza da reação química que catalisam⁽¹⁶⁾.

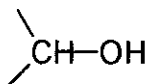
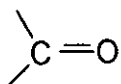
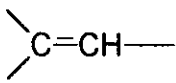
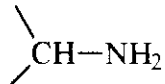
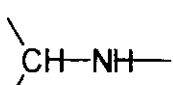
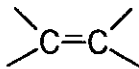
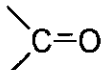
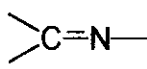
Pela classificação sistemática da IUBMB (“International Union of Biochemistry and Molecular Biology”) feita às enzimas, elas são divididas em seis classes principais e conjunto de subclasses, de acordo com o tipo de reação catalisada. Esta classificação encontra-se na Tabela III.1⁽¹⁵⁾.

Cada enzima recebe um nome recomendado, geralmente curto e apropriado para uso diário, e um nome sistemático que identifica a reação que ela catalisa, e é composto por dois nomes e quatro números de classificação. Estes números são usados quando se torna necessária uma identificação exata e sem ambigüidades de uma enzima. O número de classificação vem acompanhado do termo EC que representa “Enzyme Commission”, seguido de quatro algarismos por exemplo: oxalato oxidase EC 1.2.3.4

O primeiro algarismo indica a classe principal da enzima (1- classe das óxido-redutases), o segundo denota a subclasse (2- agindo em =C=O), o terceiro número designa sua subsubclasse (3- possui grupo nitrogenado como aceptor) e o quarto número é um número arbitrário da enzima da série de número da sua subsubclasse (4- oxalato oxidase)^(15, 16).

As reações de catálise biológicas promovidas pelas enzimas abaixam as energias de ativação das reações químicas principais.⁽¹⁸⁾ Por exemplo, uma reação catalisada enzimaticamente permite que esta ocorra de 10^6 a 10^{12} vezes mais rapidamente que a não catalisada.⁽¹⁶⁾

Tabela III.1: Classificação internacional das enzimas (nome das classes, números de código e tipos de reações catalisadas)

1. Oxido-redutases (reações de oxirredução)	2. Transferases (transferência de grupos funcionais)
1.1 Agindo em 	2.1 Grupos de um carbono
1.2 Agindo em 	2.2 Grupos aldeídicos ou cetônicos
1.3 Agindo em 	2.3 Grupos acila
1.4 Agindo em 	2.4 Grupos glicosila
1.5 Agindo em 	2.7 Grupos fosfato
1.6 Agindo em NADH: NADPH	2.8 Grupos contendo S
3. Hidrolases (reações de hidrólise)	4. Liases (adição à duplas ligações)
3.1 Ésteres	4.1 
3.2 Ligações glicosídicas	4.2 
3.4 Ligações peptídicas	4.3 
3.5 Outras ligações C—N	6. Ligases (formação de ligações, com desdobramento do ATP)
3.6 Anidridos ácidos	6.1 C—O
5. Isomerasas (reações de isomerização)	6.2 C—S
5.1 Racemases	6.3 C—N
	6.4 C—C

As enzimas não possuem efeito sobre ΔG ou K_{eq} da reação. Elas simplesmente aumentam a velocidade da reação aproximando-a do equilíbrio⁽¹⁸⁾.

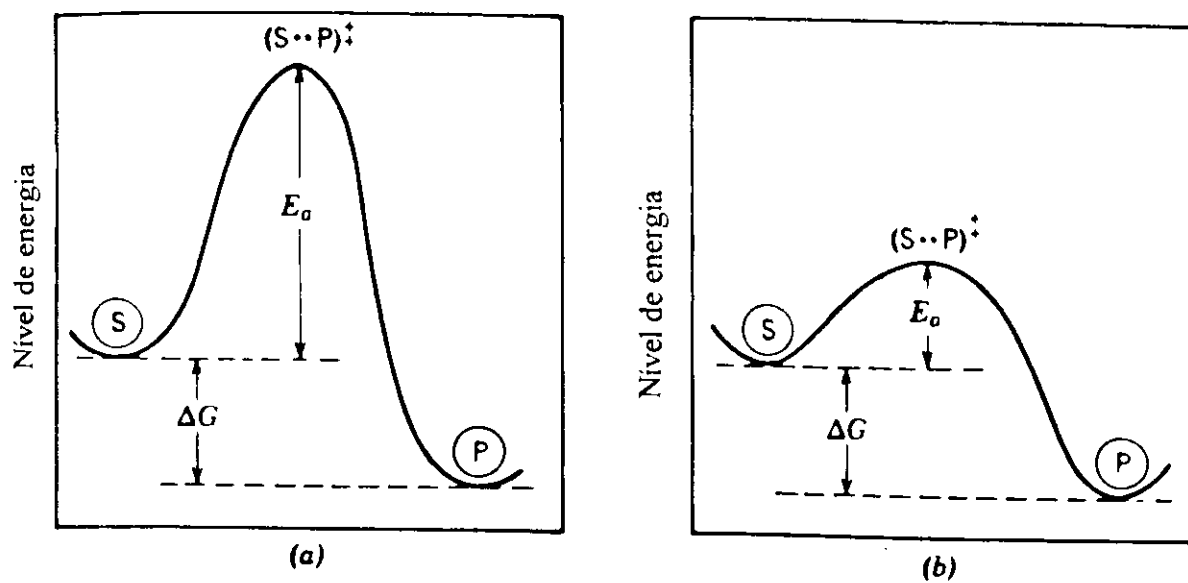


Figura III.1: ΔG e E_a de reações (a) não enzimática e (b) enzimática

Uma dada reação química, representada por $A \longrightarrow B$ ocorre, porque uma determinada fração da população de moléculas A, em um instante qualquer, possui energia suficiente para atingir uma condição ativada, denominada **estado de transição**; neste estado, a probabilidade de que uma ligação química se forme ou se rompa para originar o produto P é muito elevada. Este estado de transição está no alto da barreira energética que separa os reagentes e produtos. A velocidade de uma determinada reação química é proporcional à concentração dessa espécie no estado de transição. A **energia livre de ativação**, ΔG^\ddagger , é a quantidade de energia necessária para levar 1 mol de uma substância, em uma determinada temperatura, à condição de transição no ponto mais elevado da barreira de ativação⁽¹⁵⁾.

III.2 - Cinética Enzimática

O primeiro passo de uma catálise enzimática é a ligação com o substrato, porém, a ligação é seguida de alteração química do substrato, formando o produto⁽¹⁹⁾. Pela Figura III.2 vê-se o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação catalisada por enzima. À baixa concentração do substrato, a velocidade inicial da reação (v_0) é proporcional à sua concentração, sendo assim, de primeira ordem. À medida que a concentração de substrato aumenta, a velocidade inicial da reação se reduz; e a reação passa a ser de ordem mista. Com o aumento posterior da concentração do substrato, a velocidade de reação torna-se essencialmente independente da concentração do substrato, aproximando-se da velocidade constante, tornando-se, essencialmente, uma reação de ordem zero. Nestas condições, a enzima é considerada estar saturada com o seu substrato⁽¹⁵⁾.

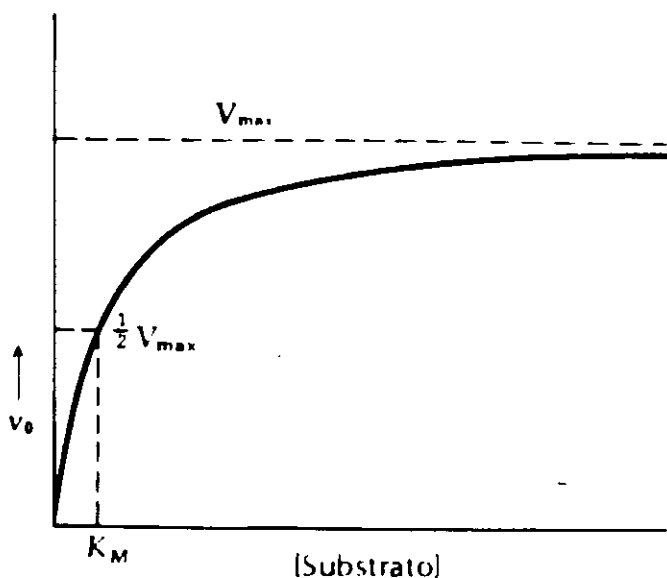
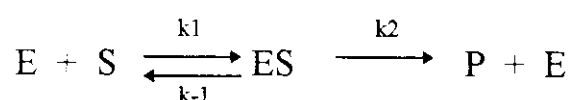


Figura III.2: Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima.

Esse efeito de saturação, levou alguns cientistas precursores, à hipótese de que o substrato e a enzima reagem reversivelmente para formar um complexo, que constituiria em uma etapa essencial na reação catalisada⁽¹⁵⁾.

Em 1913, uma teoria geral de ação enzimática e cinética foi desenvolvida por L. Michaelis e M.L. Menten. Esta teoria é fundamental para análise quantitativa da cinética enzimática e da inibição e é melhor desenvolvida para reações nas quais existam apenas um substrato⁽¹⁵⁾.

Propõe-se que a reação global seja:



Onde E, S, ES e P simbolizam enzima, substrato, complexo enzima-substrato, e produtos, respectivamente. De acordo com este modelo, quando a concentração do substrato é suficientemente alta para converter a enzima para a forma ES, a segunda etapa da reação passa a ser a determinante da velocidade da reação, que se torna insensível ao aumento da concentração do substrato. A expressão geral para velocidade desta reação é então representada por:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] \quad (1)$$

A velocidade global da produção de [ES] é:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (2)$$

A [ES] permanece praticamente constante até que o substrato se esgote. Então, a síntese de ES deve ser igual à velocidade de consumo ao longo da reação, ou seja, está no estado estacionário.

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (3)$$

A quantidade de [ES] e [E], não são medidas diretamente, mas a concentração de enzima total, $[E]_t$, é geralmente determinada. Então, na expressão da cinética global tem-se:

$$[E]_t = [E] + [ES] \quad (4)$$

Combinando-se as expressões (2), (3) e (4), tem-se:

$$k_1 ([E]_t - [ES]) [S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

Rearranjando tem-se:

$$[ES] (k_{-1} + k_2 + k_1[S]) = k_1[E]_t [S]$$

Dividindo os 2 termos por k_1 e isolando [ES]:

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

onde, K_m é conhecido como constante de Michaelis definida como:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

A velocidade inicial pode ser expressa experimentalmente medindo-se as quantidades de $[E]_t$ e $[S]$ ⁽¹⁶⁾.

$$v_0 = \left. \frac{d[P]}{dt} \right|_{t=0} = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E]_t [S]}{K_m + [S]} \quad (5)$$

A medida da eficiência catalítica da enzima através da determinação da taxa máxima em que ela converte o substrato em produto, é expresso como $V_{\text{máx.}}$, ou mais precisamente, como número de “turnover”(conversão), o número de moles de substrato convertidos em produto por minuto (min.) por miligrama (mg) de enzima, quando a enzima encontra-se saturada com o substrato⁽¹⁹⁾, ou seja, quando está toda na forma de ES⁽¹⁶⁾.

$$V_{\text{máx.}} = k_2 [E]_t \quad (6)$$

Combinando-se as equações (5) e (6) tem-se:

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx.}}[S]}{K_m + [S]}$$

Esta expressão é chamada de equação de Michaelis-Menten⁽¹⁶⁾.

A constante de Michaelis, K_m , é a concentração do substrato no qual a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima⁽¹⁶⁾, ou seja, é a constante de dissociação⁽¹⁹⁾.

O K_m da reação de um substrato tem a dimensão moles por litro, e é independente da concentração enzimática. O K_m não é um valor fixo, pois varia com a estrutura do substrato, com o pH e com a temperatura. Para enzimas que apresentam mais de um substrato, cada uma possui um K_m característico. Assim, o substrato com mais baixo valor de K_m tem maior afinidade aparente para a enzima⁽¹⁵⁾.

A relação de Michaelis-Menten, pode ser transformada algebricamente em outras formas que são mais úteis na obtenção de gráficos dos dados experimentais. Uma delas é obtida simplesmente substituindo os valores inversos de ambos os lados da equação de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{\text{máx.}}[S]}$$

Rearranjando e reduzindo, tem-se:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\text{máx.}}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx.}}}$$

que é chamada de equação de Lineweaver-Burk. Quando colocado em um gráfico de $1/v_0$ contra $1/[S]$, obtém-se uma linha reta que possui inclinação $K_m/V_{\text{máx.}}$; a interceptação no eixo de $1/v_0$ é $1/V_{\text{máx.}}$ e no eixo de $1/[S]$ é $-1/K_m$ ⁽¹⁵⁾.

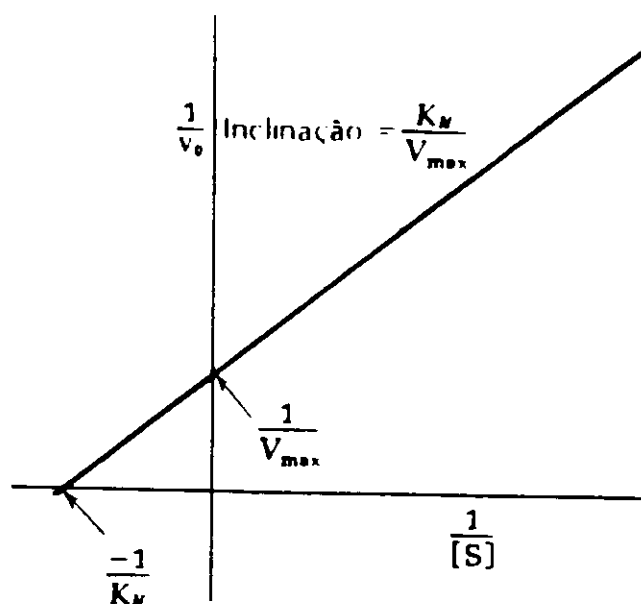


Figura III.3: Gráfico de Lineweaver-Burk (duplo- recíproco)

III.3 - Efeito do pH na atividade enzimática

Os sítios ativos da enzima são frequentemente compostos por grupos ionizáveis que devem estar na forma iônica para manter a conformação do sítio ativo, promover a ligação do substrato ou catalisar uma reação. O efeito do pH na estabilidade da enzima deve ser levado em conta no estudo sobre a ligação com o substrato ou na catálise. A estabilidade da enzima em um valor de pH, depende de muitos fatores como a temperatura, força iônica, tampão, concentração de alguns conservantes, concentração de íons metálicos contaminantes, concentração do substrato ou do cofator, e da concentração da enzima⁽¹⁸⁾.

A maioria das enzimas apresenta um pH característico em que sua atividade é máxima e acima ou abaixo desse pH, a sua atividade se reduz. O pH ótimo de uma enzima não é necessariamente idêntico ao pH de seu meio intracelular normal, que pode estar situado na parte ascendente ou descendente de seu perfil de atividade em função de pH⁽¹⁵⁾. O declínio pode resultar a partir da formação da força iônica não adequada do substrato ou da enzima, ou devido à inativação da enzima, ou pela combinação destes efeitos⁽¹⁸⁾.

Algumas vezes, a inativação da enzima pela variação de pH é causada pela imobilização desta sobre um suporte, onde a proteína é retirada do seu meio natural e exposta a diferentes condições, cujas características são determinadas pela natureza química do suporte⁽²⁰⁾.

III.4 - Efeito da temperatura nas reações enzimáticas

A termoestabilidade da enzima é uma consequência da conformação rígida da sua molécula, a qual é resultante de ligações de hidrogênio e eletrostáticas.

Uma perda da atividade enzimática está associada à abertura da estrutura globular da proteína⁽²¹⁾.

Nas reações catalisadas enzimaticamente, assim como em muitas reações químicas, a velocidade da reação aumenta com o aumento da temperatura (T). Um aumento em T implica em fornecer maior energia cinética para as moléculas dos reagentes resultando em um maior número de colisões por unidade de tempo.

As enzimas são moléculas complexas de proteína. Sua atividade catalítica resulta de um arranjo preciso das estruturas terciárias justapostas a grupos -R dos aminoácidos, formando os sítios ativos estereoespecíficos. Esta estrutura é mantida pelo grande número de ligações fracas não covalentes. Então, se a molécula absorve muita energia, esta estrutura se rompe e a enzima se desnatura, ou seja, perde a atividade catalítica.

Portanto, a temperatura ótima para os ensaios, é a temperatura máxima na qual, a enzima fornece uma atividade constante, num intervalo de tempo maior que o necessário experimentalmente⁽¹⁸⁾.

Capítulo IV

Imobilização Enzimática

IV.1 - Generalidades⁽²⁰⁾

As vantagens de utilizar a atividade e a especificidade enzimática tem incentivado o desenvolvimento da Bioquímica baseada nos procedimentos de imobilização.

Limitações na difusão, consequente do processo de imobilização, podem exercer um efeito marcante no comportamento catalítico. Considerando uma reação enzimática que segue a cinética de Michaelis-Menten, a enzima imobilizada possui uma velocidade que é limitada pela difusão do substrato na enzima. Sendo assim, a velocidade da reação enzimática será proporcional à concentração da enzima menor que uma (1) unidade de atividade.

As enzimas são parcialmente inativadas durante o processo de imobilização. Sua atividade residual em relação à forma livre pode ser de 10% ou menos. É muito provável que a diminuição da atividade causada pela perda das estruturas lábeis da enzima no processo de imobilização. Portanto, a velocidade da reação utilizando a enzima imobilizada é menor quando comparada com a velocidade de reação da enzima em sua forma livre. Para interpretar os resultados experimentais corretamente, deve-se comparar os resultados obtidos a partir da enzima imobilizada com os de sua forma não imobilizada, onde o grau de inativação corresponde à perda na atividade.

É quase certo que a inativação da enzima, sob ação de mudanças de pH, temperatura e agentes desnaturadores, envolva variações conformacionais consideráveis nas moléculas da proteína, como por exemplo, a abertura da estrutura globular da molécula proteica. Se a abertura da estrutura é responsável pela inativação da enzima, pode-se então torná-la mais rígida fixando o glóbulo da proteína enzimática em um suporte. Conseqüentemente, esta rigidez desativa a ação de alguns sítios

da enzima dificultando o processo de abertura da estrutura globular da proteína.

Entretanto, há razões para crer que o princípio geral da estabilização enzimática envolve ligações múltiplas da molécula catalisadora no suporte, tornando a macromolécula mais rígida sem necessariamente alterá-la, sendo mais estável contra desnaturação, ou seja, a inativação.

Existem diferentes formas de imobilização entre eles estão: imobilização em tecidos vegetais, imobilização por método da ligação cruzada intermolecular, imobilização por método de suporte com ligação covalente, imobilização por método de ligação química com o suporte utilizando reagentes polifuncionais, imobilização por método da oclusão e imobilização via radiação gama.

IV.2 - Imobilização em tecidos vegetais⁽²⁰⁾

Na natureza, as moléculas de proteínas estão ligadas de forma entrecruzada para que haja estabilização conformacional. Este entrecruzamento pode ser do tipo covalente (ligações bissulfito) ou não covalentes, como pontes salinas envolvendo íons metálicos (Ca^{+2} , Zn^{+2}), etc.

In vivo, a maior parte das enzimas não se encontram no estado livre, mas incorporadas em membranas biológicas ou absorvidas em suas superfícies, podendo inclusive estarem associadas a outros componentes da membrana por ligações em pontos múltiplos, não covalentes.

IV.3 - Imobilização por método da ligação cruzada intermolecular

Este método baseia-se na formação de ligações químicas na ausência do suporte. Reagentes bi ou polifuncionais são empregados para imobilizar enzimas através de ligações cruzadas intermoleculares, com formação concomitante de moléculas macroscópicas⁽²²⁾. O esquema da

Figura IV.1 mostra o mecanismo da estabilização frente à inativação de uma molécula com ligação cruzada intramolecular⁽²⁰⁾.

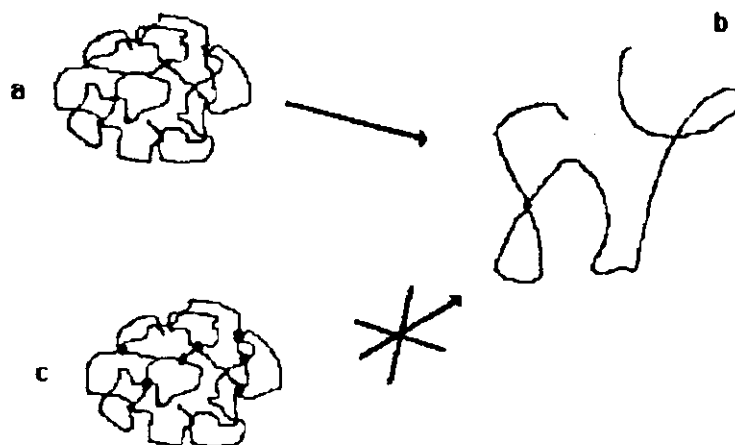


Figura IV.1 - Esquema representativo da não desnaturação: (a) molécula da enzima livre, durante aquecimento (transição de $a \rightarrow b$), (c) enzima imobilizada.

Dos reagentes polifuncionais, o glutaraldeído é o mais usado para esta técnica de imobilização devido à sua baixa toxicidade e baixo custo quando comparado com os demais reagentes. As ligações formadas pela reação entre a enzima e o glutaraldeído são irreversíveis, com elevada resistência à variações de pH e temperatura⁽²³⁾. O mecanismo mais provável sugerido para a reação com o glutaraldeído envolve adição conjugada de aminogrupos da enzima a ligações etilênicas de oligômeros α , β -insaturados, contidas na solução aquosa de glutaraldeído comercialmente utilizada⁽²³⁾.

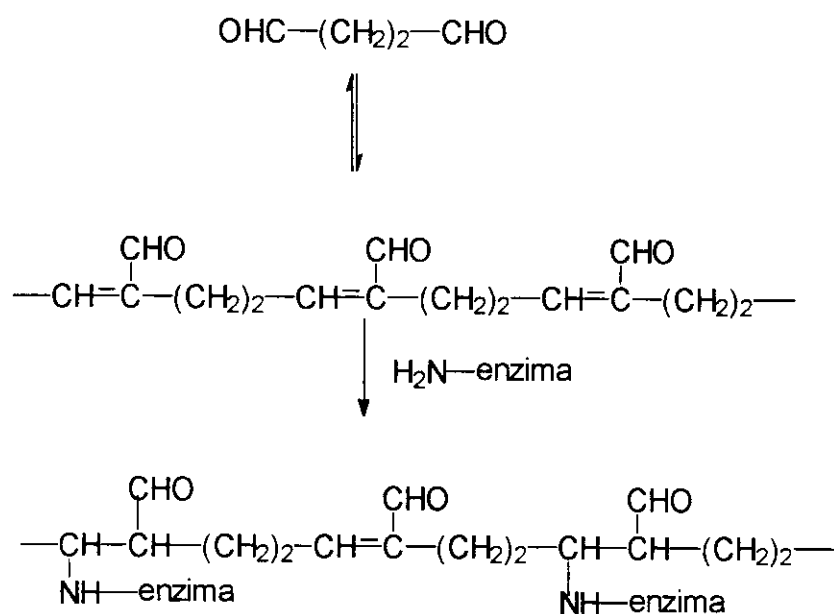


Figura IV.2 - Mecanismo mais provável sugerido para a reação com o glutaraldeído envolvendo adição conjugada de aminogrupos da enzima a ligações etilênicas de ligações α , β -insaturados, contidas na solução aquosa de glutaraldeído comercial.

Este mecanismo explica a estabilidade da ligação, a qual não pode ocorrer por uma simples formação da base de Schiff. Explica também a baixa reatividade das enzimas imobilizadas com soluções de glutaraldeído recentemente destilado⁽²³⁾. Esta técnica propicia complexos de alta atividade e grande resistência à desnaturação, explicada por fenômenos de impedimento estérico⁽²⁴⁾.

IV.4 - Imobilização por método de suporte com ligação covalente

Neste método a enzima é mantida num ambiente semelhante ao que ela está na natureza e, devido a isto, possui maior estabilidade frente aos efeitos de pH, força iônica, solventes e temperatura⁽²²⁾.

IV.5 - Imobilização por método de ligação química com o suporte utilizando reagentes polifuncionais

O suporte com grupos NH_2 livres (como por exemplo membranas do intestino de porco, colágeno e esferas de vidro), é ativado com glutaraldeído e em seguida o produto formado é acoplado com grupos NH_2 livres da enzima. Desse modo, se obtém uma camada rígida de enzima imobilizada muito estável por vários meses⁽²²⁾.

IV.6 - Imobilização por método da oclusão

Consiste no confinamento da enzima nos espaços intersticiais de polímeros, membranas semipermeáveis ou em pasta de carbono⁽²²⁾. Várias enzimas são muito sensíveis às modificações químicas e inativações causadas por imobilização via ligação covalente. Para estes casos, o método da imobilização da oclusão é o mais recomendado⁽²⁰⁾.

IV.7 - Imobilização via radiação gama

IV.7.1 - Generalidades⁽²⁵⁾

A radiação gama é uma radiação eletromagnética de origem nuclear e não atômica, de energia maior que a do raio-X e da luz.

Justamente por não possuírem carga elétrica é que os raios gama são penetrantes (centenas de metros no ar e dezenas de metros no tecido vivo). É devido ao fato dos raios gama possuírem alta energia, grande poder de penetração e capacidade de interagir com as espécies atômicas ou moleculares, que eles são considerados catalisadores excelentes, em forma de energia, para iniciarem um processo químico.

Há algumas definições de termos de unidades como a dose de radiação absorvida que é a energia média depositada pela radiação ionizante, à razão de 1 Joule, por unidade de massa, em quilograma. As unidades comumente utilizadas são o rad e o Gray (Gy).

$$1 \text{ rad} = 10^{-2} \text{ J.kg}^{-1} = 10^{-2} \text{ Gy}$$

As fontes emissoras de raios gama mais comumente encontradas são as que contêm os radionuclídeos Cobalto-60 ou Césio-137, que possuem tempos de meia-vidas de 5,26 e 30,17 anos, respectivamente. Apesar do tempo de meia-vida do Césio-137 ser maior, o Cobalto-60 é preferencialmente utilizado, pois os raios gama que ele emite são mais energéticos.

O Co-60 decai através de dois esquemas com probabilidades bem diferenciadas:

- um em que o decaimento β_1^- é seguido da emissão sucessiva de dois raios gama com energias distintas (1,173 e 1,332 MeV)
- e o outro em que o decaimento β_2^- é seguido de um único raio gama (1,332 MeV).

Tendo em vista a probabilidade altíssima de ocorrência da emissão β_1^- (99,99%), considera-se ser este o decaimento do Co-60:

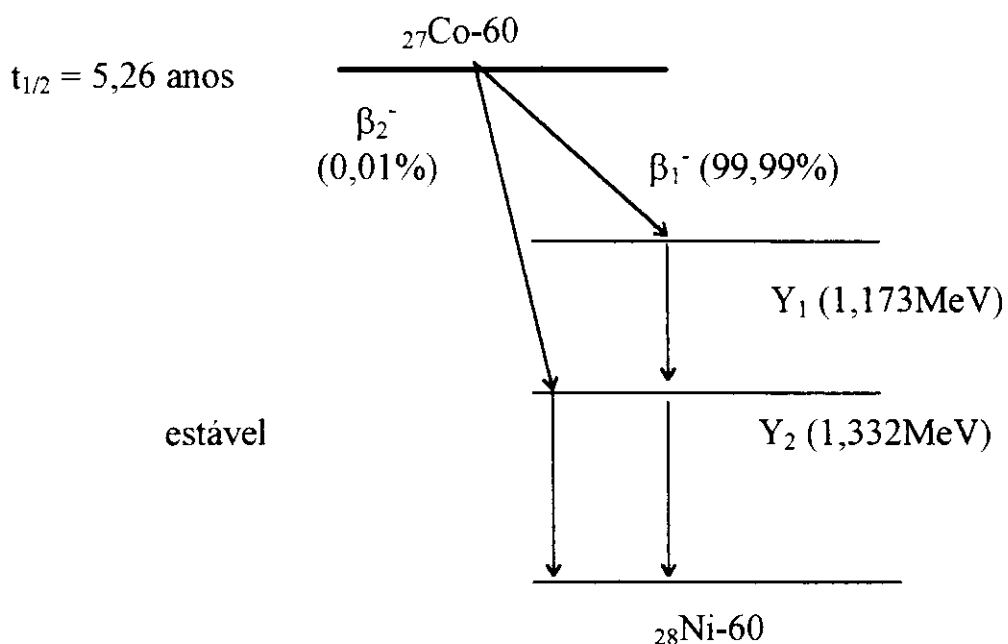


Figura IV.3 - Esquema de decaimento do Cobalto-60

Quando uma radiação ionizante incide na matéria, há interação com os elétrons das moléculas. A energia é absorvida e os elétrons são ejetados para produzir íons. A interação dos raios gama com a matéria é fortemente dependente de sua energia e ocorre de acordo com três processos de natureza física diferentes: efeito fotoelétrico, efeito Compton e formação de pares.

Em todos os três casos, os elétrons são ejetados com energia cinética suficiente para induzir ionizações adicionais ou excitações eletrônicas nas moléculas vizinhas. Os íons formados são instáveis e se decompõem. A energia é degradada com a formação de moléculas excitadas e radicais livres.

IV.7.2 - Efeito da radiação em polímeros

A interação da radiação gama com polímeros produz excitações e ionizações, ambas, resultando em radicais livres que podem causar como efeitos principais, a formação de produtos menores (degradações) ou maiores (entrecruzamento)⁽²⁵⁾.

O processo de imobilização neste caso, baseia-se em induzir a polimerização através da radiação gama à baixa temperatura. Assim, obtém-se uma matriz com estrutura porosa. A enzima é imobilizada fisicamente nos poros desta matriz. A vantagem deste método de imobilização é que as enzimas mantêm suas propriedades nativas independente de reações dos grupos do centro ativo⁽²⁶⁾.

IV.7.3 - Imobilização enzimática via radiação gama ^(23,27)

Neste processo, a radiação gama pode ser utilizada para produzir radicais livres que são formados nos dois componentes, ou seja, na matriz e na enzima, que posteriormente, são combinados dando origem à ligação covalente conforme o esquema representado a seguir:



Capítulo V

Biossensores

V.1 - Generalidades

A tecnologia enzimática, tem explorado o uso de componentes biológicos em sistemas analíticos através do desenvolvimento da imobilização de enzimas e imunocomponentes que possam ser reutilizados⁽²⁸⁾.

Neste processo a enzima imobilizada é colocada sobre a superfície de um eletrodo sensível ao produto da reação enzima-substrato. Quando o eletrodo enzimático é colocado na solução, contendo o substrato, este difunde-se na camada enzimática e pela reação catalítica, produz um produto que é detectado pelo eletrodo⁽²⁹⁾. Sendo assim, o biossensor pode ser definido como um sistema constituído de um componente biológico ativo e um transdutor, que estão intimamente em contato, transformando a concentração de um analito em um sinal elétrico mensurável.

A combinação das propriedades enzimáticas com eletrodos forma sistema de detecção seletivo que pode ser de duas formas: eletrodos enzimáticos, onde a enzima é imobilizada em contato direto com o eletrodo; ou reator enzimático, onde a enzima é imobilizada em um reator colocado antes do eletrodo, em um sistema em fluxo⁽¹⁷⁾.

Para a construção de um biossensor, deve-se seguir os seguintes critérios⁽²²⁾:

- 1- Escolha da enzima - escolhe-se uma enzima que reaja com a substância a ser analisada. O ideal seria envolver o uso da função primária da enzima, isto é, a reação principal Enzima-Substrato.
- 2- Obtenção da enzima - as enzimas podem estar na forma pura ou impura. Algumas enzimas impuras são estáveis podendo ser usadas por uma semana. Outras têm atividade muito baixa não podendo ser utilizadas sem purificação.
- 3- Imobilização da enzima
- 4- Colocação da enzima imobilizada no sensor adequado - a enzima imobilizada é acoplada à base de um sensor eletroquímico adequado, que

responda ao desaparecimento de um dos reagentes ou a um dos produtos formados.

Dentre os biossensores, os mais utilizados até o momento tem sido os potenciométricos e os amperométricos.

V.2 - Biossensores Potenciométricos

Biossensores potenciométricos utilizam transdutor potenciométrico para monitorar as variações nas concentrações do produto ou do substrato⁽³⁰⁾. Neste biossensor a enzima imobilizada é acoplada diretamente sobre a superfície do transdutor potenciométrico.

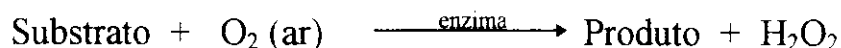
V.3 - Biossensores Amperométricos

Os biossensores amperométricos têm atraído a atenção dos eletroanalíticos desde que surgiu o primeiro eletrodo enzimático.

Estes sensores são os mais exatos devido à proporcionalidade entre a intensidade de corrente e a concentração. Então, a enzima imobilizada é acoplada a um transdutor amperométrico, que vai detectar a corrente de acordo com a variação das concentrações do produto ou do substrato da enzima.

Eles podem ser classificados em dois grandes grupos de acordo com o tipo de enzima. Caso a enzima utilizada seja da classe das oxidases, pode-se detectar O₂ consumido ou o peróxido de hidrogênio produzido. No caso das deidrogenases, determina-se um cofator enzimático ou um mediador de óxido-redução⁽¹⁷⁾.

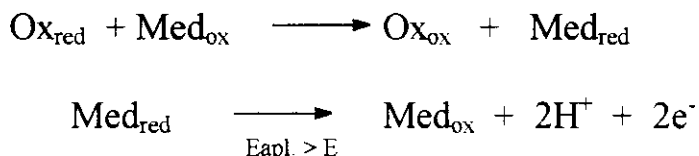
Pela disponibilidade comercial na forma purificada e sendo altamente ativa, as enzimas óxido-redutases são as mais utilizadas para análises químicas cujas reações nas quais elas atuam seguem o esquema geral:



Como o O_2 é um bom oxidante, a reação é termodinamicamente favorável à formação do produto. No caso da utilização das oxidases, onde o oxigênio é o acceptor eletrônico fisiológico, o problema da sua flutuação pode ser eliminado pela escolha de um acceptor alternativo de transferência de elétrons, ou seja, de um mediador⁽³¹⁾.

V.3.1 - Mediadores Eletrônicos

O oxigênio, que se constitui em um acceptor natural de elétrons, pode ser substituído por outras substâncias acceptoras de elétrons, conhecidas como mediadores. O mediador (Med_{ox}) reoxida a enzima oxidase da forma reduzida (Ox_{red}), em uma primeira etapa rápida, que é seguida de reoxidação eletroquímica do mediador na forma reduzida (Med_{red}), transportando os elétrons para o eletrodo, caso o potencial aplicado seja mais positivo que o potencial normal E^0 , do mediador⁽¹⁷⁾.



Os aceptores de elétrons, são compostos que possuem potenciais redox numa faixa de potencial ótimo entre -150 a 0 mV vs ECS. Isto permite que substâncias interferentes, facilmente oxidáveis, como ascorbato e paracetamol, não interfiram nos sinais das respostas obtidas⁽¹⁷⁾.

Geralmente, os mediadores são espécies que possuem alta massa molecular e permitem a troca de elétrons entre o centro redox da enzima e o eletrodo de trabalho (ex: eletrodos de ouro, platina ou carbono)⁽³²⁾.

O mediador ideal para uso em eletroquímica deve reagir rapidamente com a enzima, exibir cinética heterogênea reversível e ter baixo potencial de regeneração. Deve ser estável frente a variações de pH, temperatura, estado redox e à molécula de oxigênio⁽³²⁾.

A Figura V.1 mostra o esquema de uma reação enzimática envolvendo mediador.

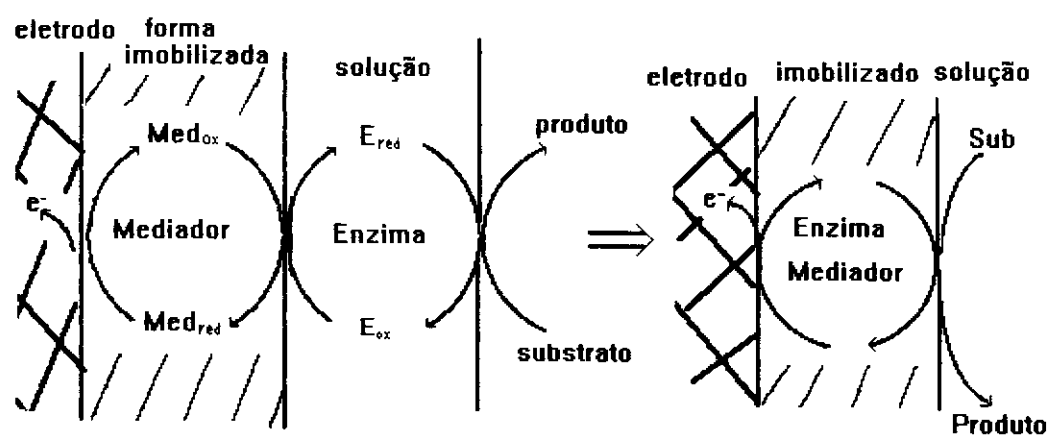


Figura V.1 - Esquema da reação catalisada enzimaticamente na qual atua o mediador onde E representa enzima e Med o mediador.

V.3.2 - Reator Enzimático⁽¹⁷⁾

Enzimas imobilizadas em um reator aparentam maior estabilidade que as imobilizadas na superfície do eletrodo.

Há várias configurações de reatores, dentre as quais, as mais usuais são os reatores do tipo tubular aberto, recheado e semi-recheado.

No reator tubular aberto, a enzima é colocada de maneira a recobrir a parede interna do tubo. Este reator apresenta a desvantagem de ter pequena área de superfície disponível para imobilização, sendo necessário, então, utilizar um tubo de grande extensão.

O reator recheado é o mais utilizado. Neste caso, a enzima é imobilizada sobre um suporte que preenche um tubo de nylon. Sua eficiência depende de vários fatores, tais como o processo de imobilização enzimática, a escolha do suporte e do tamanho do mesmo. Partículas pequenas possuem maiores áreas de superfície, o que é importante para a imobilização de maior quantidade de enzima, porém, pode apresentar problemas de impedimento do fluxo.

No reator semi-recheado, há um compromisso entre o reator tubular aberto e o recheado em termos de dispersão, eficiência da reação e pressão de retorno para evitar a compactação do material enzimático. Neste reator, a enzima imobilizada no suporte é perfilada num tubo de nylon ou espiral de vidro.

A reação enzimática que ocorre no reator pode ser monitorada utilizando-se um eletrodo. Algumas vantagens podem ser citadas, como a maior quantidade de enzima imobilizada que favorece a formação do produto, implicando em uma maior conversão do substrato. Outra vantagem é que a eficiência do reator não é afetada pelas pequenas variações na velocidade de fluxo, pH, força iônica, temperatura, assim como a presença de inibidores e ativadores em baixas concentrações.

Durante seu caminho até o detector, a amostra líquida, injetada no sistema de fluxo contínuo, se dispersa de modo reprodutível e faz com que o analito reaja com os reagentes. O produto chega ao detector de forma concentrada, e é detectado em forma de pico. A altura deste pico é proporcional à concentração do produto da reação, enquanto que a integração da área do pico é proporcional à quantidade de amostra injetada.

Capítulo VI

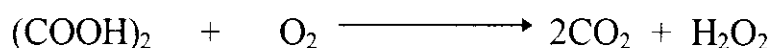
Oxalato Oxidase

VI.1 - Características Gerais

A oxalato oxidase é uma enzima pertencente ao grupo das oxidases que constituem uma das principais classes das oxidoreduktases. O termo “oxidase” é um nome recomendado para oxidoreduktases que utilizam a molécula de O_2 como aceptor de elétrons. Pode também ser definido como sendo o grupo de enzimas que catalisam as reações nas quais todos os elétrons provenientes do substrato sejam transferidos para o O_2 , um agente oxidante natural, para formar qualquer produto reduzido de O_2 conhecido nos sistemas biológicos (como por exemplo a H_2O e a H_2O_2)^(17, 33). A reação global de oxidação oxida irreversivelmente o substrato a produto, devido à forte ação oxidante do oxigênio molecular⁽¹⁷⁾.

Uma flavoproteína oxidase simples, como a oxalato oxidase, possui a flavina como sendo o único grupo prostético reconhecido que serve para transferir elétrons oriundos do substrato. Assim, são caracterizados por fortes ligações com cofatores redox ativos, sendo o mais comum a FAD (flavina-adenina dinucleotídeo) e FMN (flavina mononucleotídeo), mas que, na sua forma purificada, não necessita de um cofator^(17, 33, 34).

A oxalato oxidase EC1.2.3.4, catalisa a oxidação aeróbica do ácido oxálico e é encontrada em musgos, plantas superiores e algumas espécies de fungos. A enzima foi descoberta por Houget *et al* em 1927 em musgos criados em água fresca catalisando a reação:



Então, quantidades estequiométricas de ácido oxálico se reduzem a medida que há formação de CO_2 ⁽³⁴⁾.

VI.2 - Ativadores e inibidores da oxalato oxidase

Vários ânions e cátions como cálcio, cobre, fluoreto, assim como, alguns sais como os de cloreto, acetato, fosfato e citrato de sódio, inibem a enzima causando a diminuição dos sinais detectados nas análises químicas de ácido oxálico. Então, utiliza-se algumas substâncias ativadoras que aumentam a atividade enzimática e o tempo de vida da enzima^(35, 36).

A ativação pode ser feita com adição de 8-hidroxiquinolina e/ou EDTA, devido à complexação de algumas impurezas metálicas presentes que provocam a inibição da enzima, acarretando formação de espécies que possam transportar elétrons, ou que atuem sobre o sítio ativo da enzima.

O cianeto em baixas concentrações, provoca um efeito similar que ao do EDTA e da 8-hidroxiquinolina, ou seja, complexando metais, aumentando a atividade da enzima.

Compostos como flavina atuam como cofator, ativando também a enzima. Além destes compostos, algumas quinonas, como a hidroxiquinona, p-quinona e a quinolina, ativam a enzima⁽³⁴⁾.

Mesmo com a adição destes ativadores, a oxalato oxidase sofre grande interferência causada por ácido L-ascórbico, comumente presente em amostras biológicas, devido ao seu potencial redutor⁽⁹⁾.

Parte B

Parte Experimental

Capítulo VII

Reagentes e Aparelhagem utilizados

VII.1 - Reagentes Utilizados

- Glutaraldeído 25% (m/m), Aldrich em H₂O posteriormente diluído para 15% (m/m) em H₂O
 - Glicina p.a. 99%, Carlo Erba
 - Ácido Oxálico p.a. 99%, Sigma nº 0-0376 lote 112H0252
 - Enzima oxalato oxidase EC 1.2.3.4 , Sigma nº 04127 lotes 72F-3878 e 88F3850 com 0,71U/mg
 - Kit enzimático, Sigma Diagnostics nº 591-2 lotes 063H-6216 e 084H-6038 contendo 0,17U/mg de oxalato oxidase e 5,55U/mg de peroxidase
 - Grafite, Fluka pureza aproximada de 99,9% e cinza ~ 0,05%
 - Azul de metileno p.a., Carlo Erba
 - Azul de meldola p.a. 90%, Aldrich
 - Sílica gel, Fluka com 70-230 mesh, diâmetro médio de 60 Å e área superficial de 500 m² /g
 - Folhas de caruru provenientes de Presidente Venceslau
 - Beterrabas e cevada obtidas no mercado local.
- Os demais reagentes utilizados também foram de grau analítico.

VII.2 - *Aparelhagem utilizada*

- Unidade pO_2 - pCO_2 tipo OP-925/2 - Radelkis
- Célula modelo OP-925/2 - Radelkis
- Analisador de pH/ íon OP-271 - Radelkis
- Banho termostático - Colora tipo KT10K
- Eletrodo Radelkis OP7113-S adaptado para determinações de CO_2
- Injetor comutador automático Micronal B352
- Bomba peristáltica Ismatec mp13GJ-4
- Célula voltamétrica com sistema de três eletrodos
- Célula de detecção amperométrica constituído de três eletrodos
- Potenciostato/ Galvanostato PAR modelo 273A interfaceado com microcomputador
- Potenciostato Ecochemie Autolab PGSTAT20 interfaceado com microcomputador

Capítulo VIII

Técnicas de Imobilização

VIII.1 - Imobilização enzimática

VIII.1.1 - Imobilização em tecidos vegetais

A enzima oxalato oxidase é encontrada em fungos, líquens, musgos e em algumas plantas superiores. Mais especificadamente pode-se citar a beterraba, a cevada, o sorgo, o caruru e a casca de banana, entre outras fontes.

Para construção do biossensor potenciométrico, utilizaram-se fatias de talo de beterraba vermelha (*Beta vulgaris rapacea*). Os talos foram cortados em pedaços de aproximadamente 5 cm de comprimento, condicionados em solução de KCl 1% (m/m) por 15 min. e fatiados em finas camadas, de cerca de 0,5 mm de espessura, e usados como suporte, conforme mostra a Figura VIII.1.

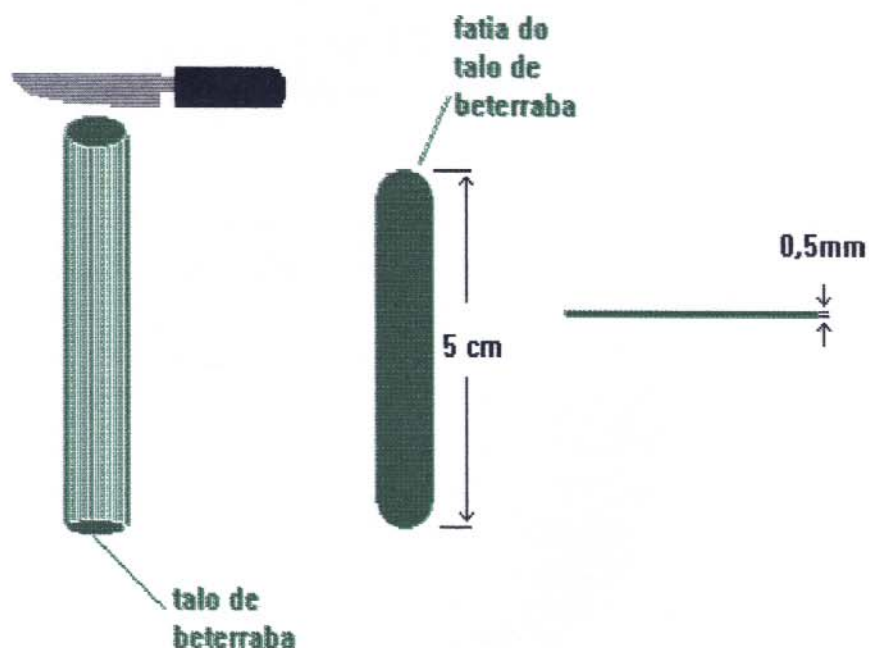


Figura VIII.1 - Sentido do corte do talo de beterraba a ser utilizado como suporte para imobilização enzimática.

Para construção do reator enzimático, utilizou-se 0,16 g de folhas de caruru cortadas em pedaços de aproximadamente 15 mm², e condicionadas em solução de KCl 1% (m/m) por 15 min.

VIII.1.2 - Imobilização por método de suporte com ligação covalente

As fatias de beterraba, descritas no item VIII.1.1, foram condicionadas em 1 mL da solução da enzima oxalato oxidase (EC 1.2.3.4) do “kit” enzimático (3U/mL) previamente reconstituída em solução tampão succinato 0,05 mol/L, pH=3,8 durante uma semana, à temperatura de cerca de 0°C.

VIII.1.3 - Imobilização por método da ligação química com suporte utilizando reagentes polifuncionais

Como suporte utilizaram-se as fatias do talo de beterraba, descritas no item VIII.1.1, nas quais foi imobilizada a enzima purificada oxalato oxidase (EC 1.2.3.4) do kit enzimático (3U/mg). Utilizou-se solução de glutaraldeído 15% (m/m), como reagente polifuncional, para recobrir as fatias de beterraba, condicionando por 1 noite em geladeira. As fatias foram depois lavadas 15 vezes com água destilada, 2 vezes com solução de glicina 0,1 mol/L e mais 3 vezes com água destilada. Posteriormente, foram colocadas em 1 mL de solução da enzima (3 U/mL), previamente reconstituída em solução tampão succinato 0,05 mol/L pH=3,8, por uma semana, à temperatura de cerca de 0°C.

VIII.1.4 - Imobilização via radiação gama

As fatias de beterraba descritas em VIII.1.1 foram colocadas em ampolas de “pirex” de 1 cm de diâmetro externo e submetidas aos seguintes ambientes: ar atmosférico, ou nitrogênio, ou argônio, ou vácuo. Algumas fatias de beterraba foram irradiadas na presença do tampão citrato 0,05 mol/L, pH= 4,0 contendo 1 mmol/L de EDTA.

No método da selagem em ar atmosférico, usou-se um maçarico para fechar as ampolas. Para selagem a vácuo, utilizou-se uma torneira de três vias (Figura VIII.2)⁽²⁵⁾. A ampola contendo material foi conectada a torneira, que permitia interligá-la a uma bexiga com nitrogênio e a uma bomba de vácuo. Primeiramente, fez-se vácuo na ampola e a seguir passou-se nitrogênio no interior desta, pela manipulação da torneira. Repetiu-se esta operação por 3 vezes, finalizando com o vácuo enquanto lacrava a ampola com auxílio de maçarico. Para aquelas com ambiente de nitrogênio e argônio, seguiu-se o mesmo procedimento citado, finalizando a operação com o gás nitrogênio ou argônio durante o processo de lacrar as ampolas.

Em seguida, estas ampolas foram colocadas em recipiente de isopor contendo gelo (0°C) e irradiadas com radiação gama numa dose de 1Mrad, tendo-se Co-60 como fonte emissora.

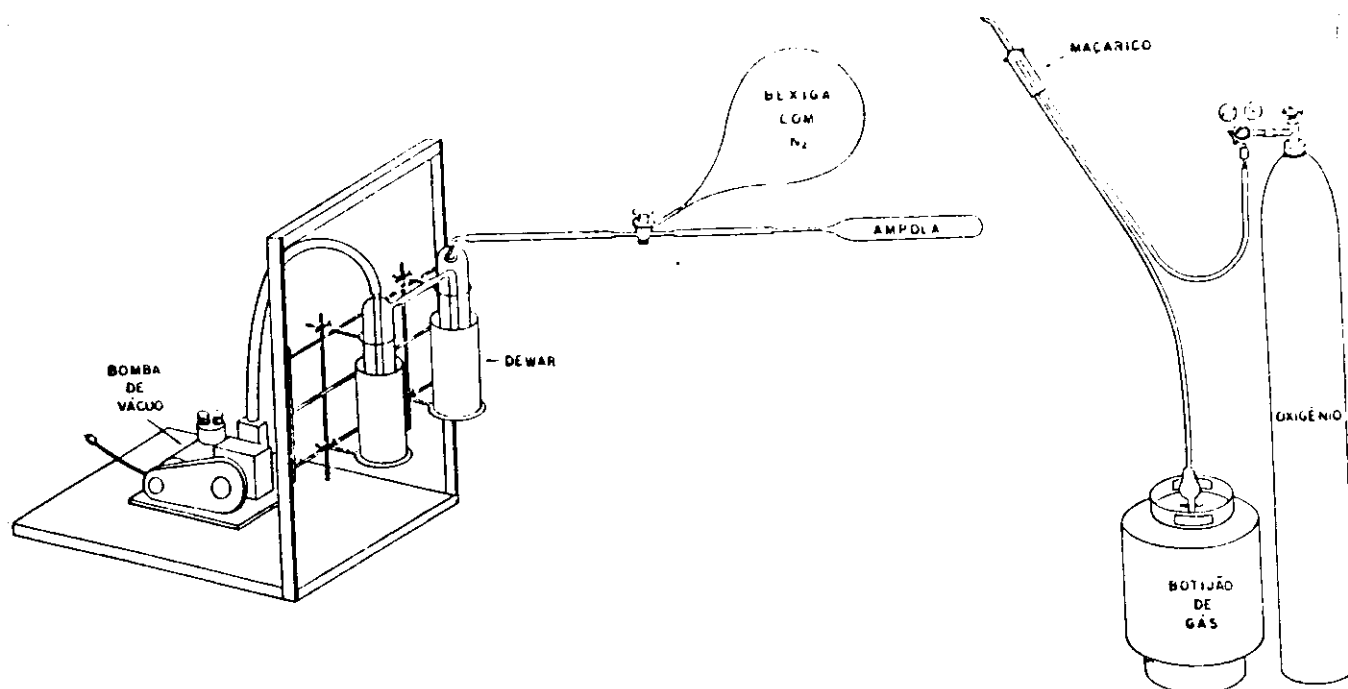


Figura VIII.2 - Sistema utilizado para selar as ampolas contendo o material a ser irradiado sob vácuo, nitrogênio ou argônio.

VIII.1.5 - Imobilização por método da oclusão

Pesaram-se cerca de 5 mg de grafite, 5 mg de sílica gel funcionalizada, com mediador previamente imobilizado, e 3 mg de oxalato oxidase purificada EC 1.2.3.4 (0,71U/mg). Homogeneizou-se e adicionaram-se 25 μ L de nujol. Misturou-se até obtenção de uma pasta uniforme.

VIII.2 - Imobilização dos mediadores

VIII.2.1 - Azul de metileno imobilizado em sílica funcionalizada com óxido de titânio

Cerca de 0,2 g de sílica gel funcionalizada com óxido de titânio⁽³⁷⁾ foram colocadas em um recipiente contendo 4 mL de solução de azul de metileno 1mmol/L por aproximadamente 30 min. Posteriormente, lavou-se o material 5 vezes com água destilada e secou-o em estufa a 100°C.

A inorganofuncionalização da superfície da sílica foi feita pesando-se cerca de 80 g de sílica gel previamente seca em estufa a 150°C sob vácuo por 4 horas. Adicionou-se a seguir 400 mL de tetracloreto de carbono anidro e 20 mL de tetracloreto de titânio. Refluxou-se por 10 h com agitação constante, em atmosfera de nitrogênio. Filtrou-se e lavou-se com CCl₄. Secou-se a 130°C sob vácuo por 4 h. Deixou-se em ambiente de vapor de água para hidrólise lenta, lavou-se com água deionizada e secou-se novamente à vácuo por 4 h a temperatura de 150°C⁽³⁷⁾.

VIII.2.2 - Azul de meldola em sílica funcionalizada com óxido de titânio-fosfato.

Aproximadamente 0,1 g de sílica gel funcionalizada com óxido de titânio-fosfato⁽³⁾ foram colocadas em um béquer de 25 mL contendo 10 mL de solução de azul de meldola 2% (m/m). Deixou-se em repouso por 30 min. e lavou-se 10 vezes com água destilada. Filtrou-se à vácuo e secou-se ao ar.

A preparação da sílica com óxido de titânio-fosfato, consistiu em pesar 20 g de sílica funcionalizada com óxido de titânio, adicionar 200 mL de solução 0,1 mol/L de H_3PO_4 e agitar por 8 h. Lavar, filtrar e secar a vácuo numa temperatura aproximada de $80^{\circ}C$ ⁽³⁸⁾.

Capítulo IX

Construção dos biossensores

IX.1 - Biossensor Potenciométrico

As fatias do talo de beterraba com a enzima oxalato oxidase imobilizada, conforme capítulo VIII nos itens 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4, foram presas diretamente sobre a superfície do eletrodo sensível a dióxido de carbono com auxílio de uma fita de teflon como mostra a Figura IX.1.

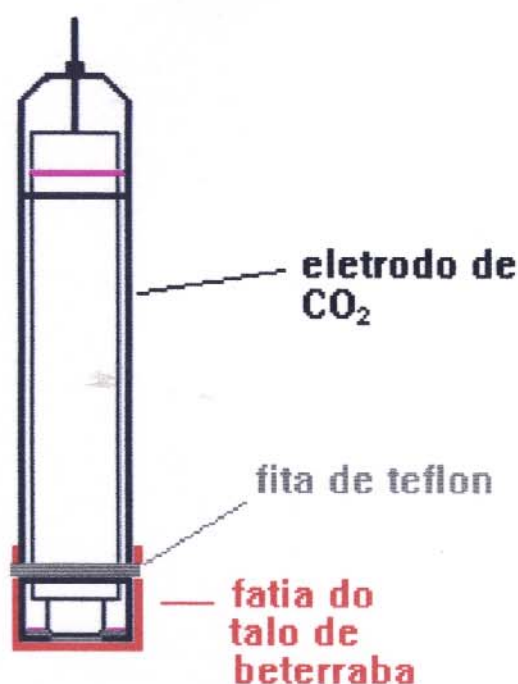


Figura IX.1 - Eletrodo sensível ao gás dióxido de carbono com fatia de beterraba presa em sua superfície.

IX.1.1 - *Transdutor potenciométrico*⁽³⁹⁾

O transdutor potenciométrico utilizado foi o eletrodo de CO_2 , que consiste na combinação de um vidro sensível a pH, um eletrodo de referência e uma membrana permeável a gás (Figura IX.2). Entre o eletrodo de vidro e a membrana, há um filme de solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3)/ NaCl . Quando o eletrodo é exposto à solução contendo CO_2 , moléculas deste gás difundem através da membrana permeável alterando o pH da solução interna de bicarbonato. Esta variação de pH, ou seja, do potencial do eletrodo, está diretamente relacionada à pressão parcial do gás (Lei de Henry).

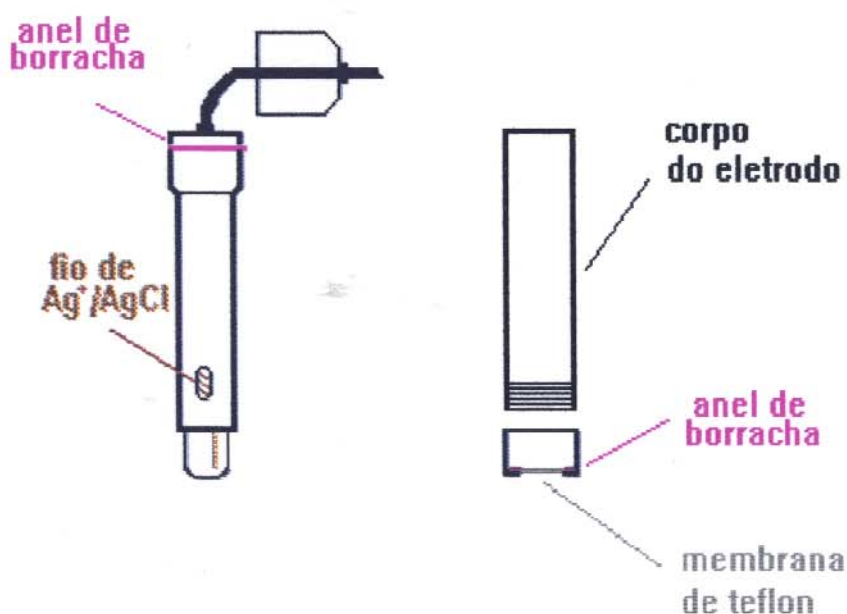


Figura IX.2 - Representação das partes que compõem o eletrodo sensível ao gás dióxido de carbono.

A solução de referência interna, foi constituída de solução de NaHCO_3 0,01 mol/L contendo NaCl 0,5 mol/L.

IX.2 - Biossensor Amperométrico

A enzima oxalato oxidase imobilizada conforme item VIII.1.5, foi colocada no eletrodo de platina como mostra a Figura IX.3. Após colocar a pasta de carbono, a superfície foi nivelada com auxílio de um papel sulfite apoiado sobre uma placa de vidro.

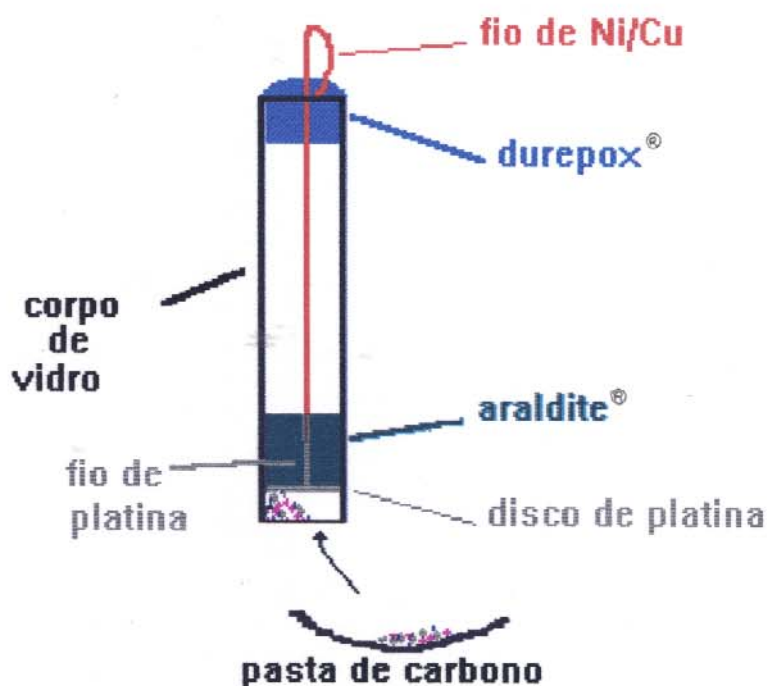


Figura IX.3 - Eletrodo de platina com pasta de carbono colocada em contato direto com a superfície de platina.

Eletrodos quimicamente modificados foram construídos para estudos do comportamento dos mediadores. Para isto, pesaram-se 5 mg de grafite e 5 mg de sílica gel funcionalizada com mediador imobilizado. Misturou-se em um vidro de relógio e adicionaram-se 25 μL de nujol. Homogeneizou-se até obter uma pasta uniforme.

IX.2.1 - Transdutor amperométrico

Utilizou-se um eletrodo de platina para a construção deste biossensor, o qual passou a ser o eletrodo de trabalho a ser utilizado na célula de medida. O eletrodo de platina está representado na Figura IX.4.

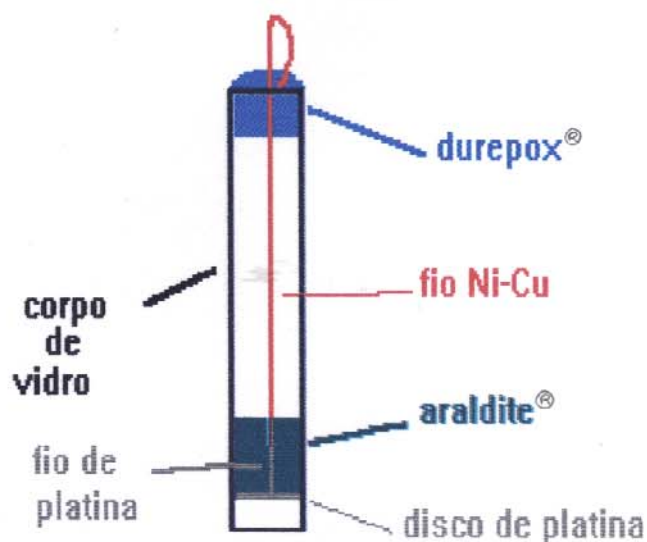


Figura IX.4 - Eletrodo de platina com corpo de tubo de vidro, acoplado com um disco de platina de 4 mm de diâmetro, cuja ponta possui profundidade de 1 mm.

IX.3. - Reatores Enzimáticos

IX.3.1 - Reator Enzimático com detecção amperométrica

Preencheu-se uma coluna de 2,1 mm de diâmetro interno e 107 mm de comprimento com folhas de caruru tratadas conforme item VIII.1.1 colocadas de forma a ficarem perfiladas ao longo do tubo conforme Figura IX.5.

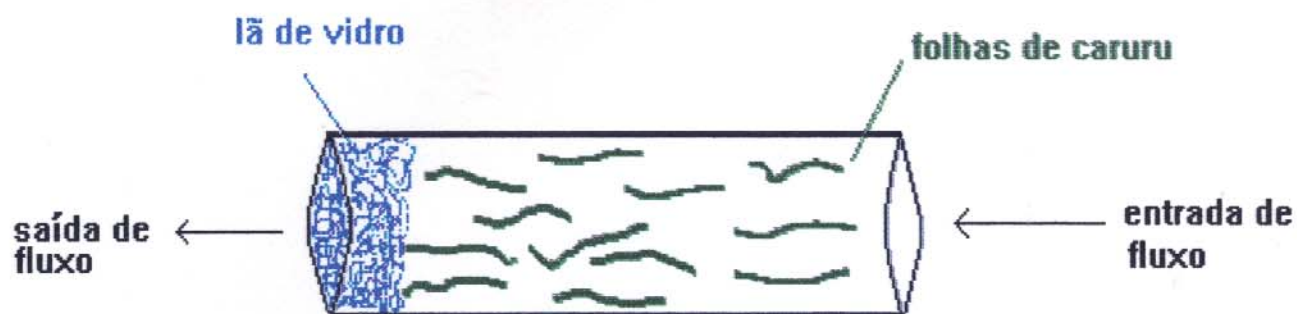


Figura IX.5 - Reator enzimático constituído de uma coluna de 2,1 mm de diâmetro interno e 107 mm de comprimento contendo folhas de caruru.

IX.3.2 - Reator Enzimático com detecção potenciométrica

Para estudos das condições de pH das soluções utilizadas montou-se um reator enzimático para medidas potenciométricas. Este reator, consistiu de uma barra magnética de formato circular com uma cavidade no centro onde foram colocadas 0,4 g do material biológico cortados em pequenos pedaços (talo, semente e semente germinada de beterraba) que foram presas com uma rede de nylon e uma borracha conforme mostra a Figura IX.6.

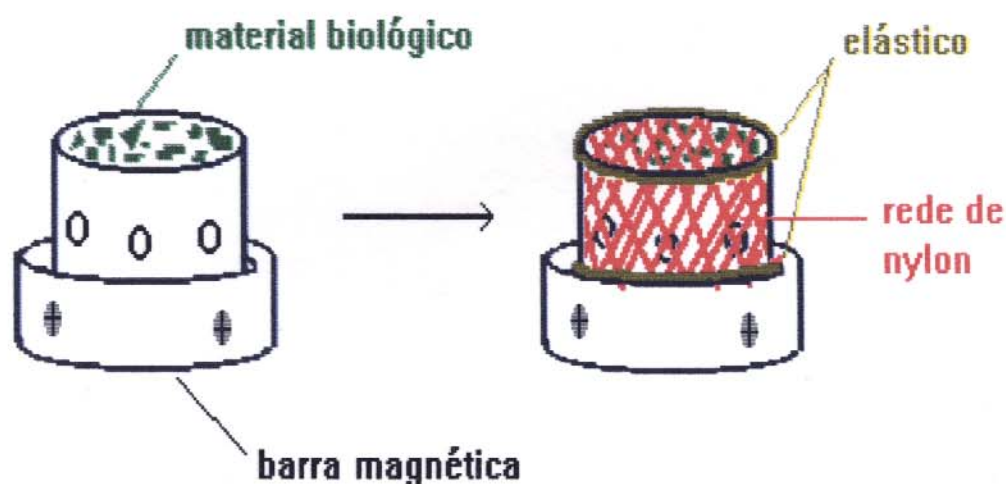


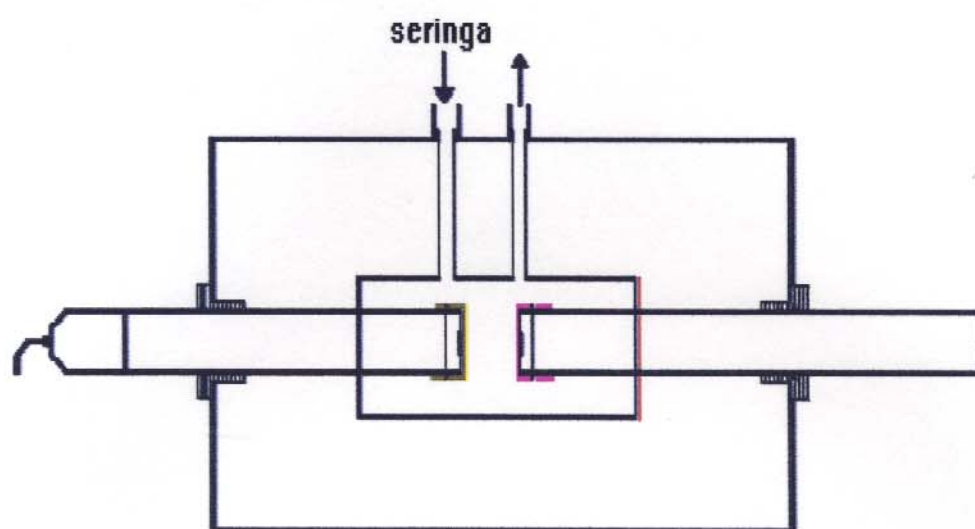
Figura IX.6 - Reator enzimático para detecção potenciométrica com 0,4g de material biológico presas com uma rede de nylon e uma borracha, que foi utilizado também como barra magnética da solução.

Capítulo X

Células Utilizadas

X.1 - Células utilizadas com biossensor potenciométrico

A princípio, utilizou-se a célula da Radelkis modelo OP925/2, termostatzada a 30°C, de volume igual a 40 µL acoplada à unidade tipo OP-925/2, que monitora a variação de pCO₂ presente na solução de ácido oxálico conforme Figura X.1. Nesta célula, o biossensor foi colocado em um dos orifícios e no outro orifício, oposto a este, fixou-se o corpo de um eletrodo revestido com um filme de PVC. A solução de ácido oxálico foi inserida na célula com auxílio de uma seringa de 2,5 mL conectada a um tubo de teflon, injetando-se um volume de 1 mL de soluções de ácido oxálico em diferentes concentrações.



● filme transparente de PVC

● fatia do talo de beterraba

Figura X.1 - Célula de 40 μL com termostatização em cujos orifícios se encaixam os eletrodos. Neste modelo, utilizou-se eletrodo sensível a CO_2 com fatia de beterraba presa em um dos lados e do outro lado, o corpo de um eletrodo revestido com filme de PVC.

Uma outra célula usada posteriormente é mostrada na Figura X.2. Esta célula, com capacidade de 10 mL, permite um borbulhamento contínuo de O_2 previamente tratado com solução saturada de $\text{Ba}(\text{OH})_2$. A temperatura foi mantida constante em 30°C utilizando-se um banho termostático, com agitação constante. Solução tampão citrato 0,05 mol/L contendo 1 mmol/L de EDTA e 2 mmol/L de 8-hidroxiquinolina foi colocada com auxílio de uma pipeta volumétrica de 10 mL e, em seguida, adicionou-se 100 μL de solução estoque de ácido oxálico 0,1 mol/L. Estas soluções foram trocadas para cada

seqüência de leituras. Este biossensor foi acoplado a um analisador de íons/pH OP271 da Radelkis, cujos resultados foram obtidos em variações de potenciais (ΔE).

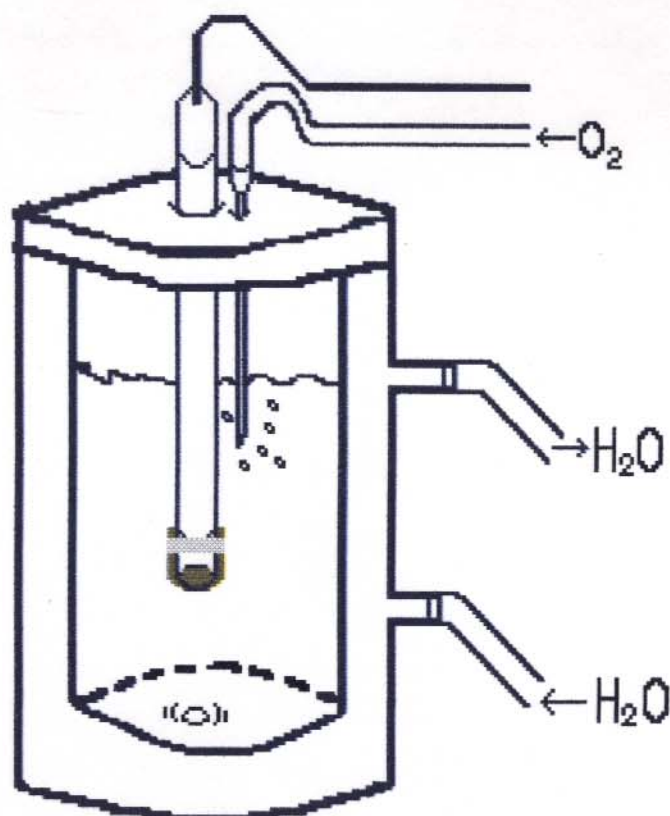


Figura X.2 - Célula de camisa termostaticada de volume igual a 10 mL, com agitação magnética e borbulhamento contínuo de O_2 , previamente tratado com solução saturada de $Ba(OH)_2$.

X.2 - Célula utilizada com biossensor amperométrico

A célula utilizada consiste de um recipiente de vidro de 5 mL, fechado com uma tampa de PVC contendo 3 orifícios onde são colocados os eletrodos de referência, trabalho e auxiliar. Há também, mais dois orifícios, um para borbulhamento de nitrogênio e outro para saída conforme mostra a Figura X.3 além de um outro orifício para adição de amostras.

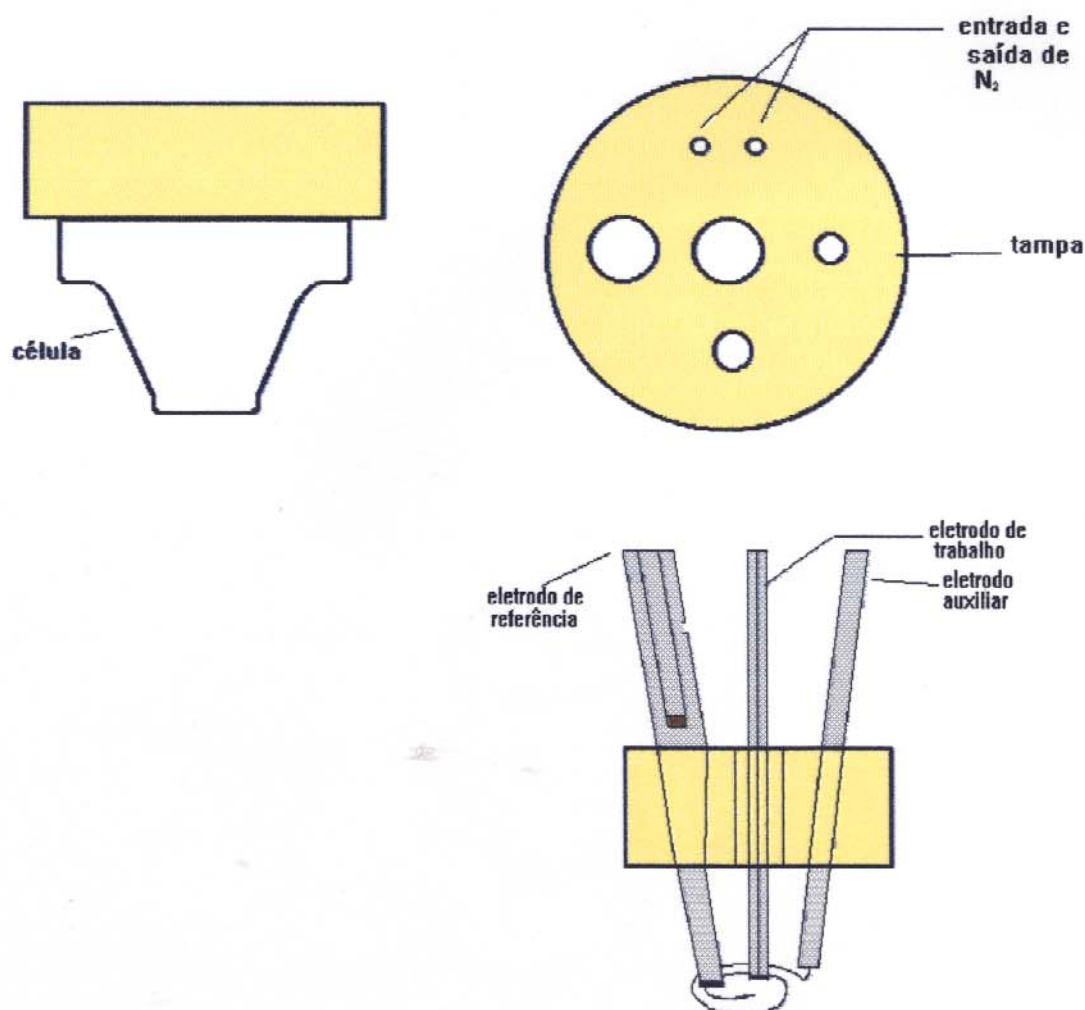


Figura X.3 - Célula utilizada para estudos eletroquímicos, com orifícios para acoplamento de eletrodos de referência, auxiliar e trabalho, além de borbulhamento do gás nitrogênio (entrada e saída) e adição de amostras.

Utilizou-se como eletrodo de referência o Eletrodo de Calomelano Saturado (ECS) e como auxiliar um fio de platina em forma espiral.

X.3 - Célula amperométrica utilizando reator enzimático

A célula de detecção amperométrica consistiu de um eletrodo de trabalho de platina na forma de disco de $0,2 \text{ mm}^2$ de superfície, como eletrodo auxiliar, uma lâmina de platina perfurada de $0,5 \text{ mm}$ de diâmetro interno, espessura de $0,2 \text{ mm}$ e como eletrodo de referência o ECS como mostra a Figura X.4⁽⁴⁰⁾.

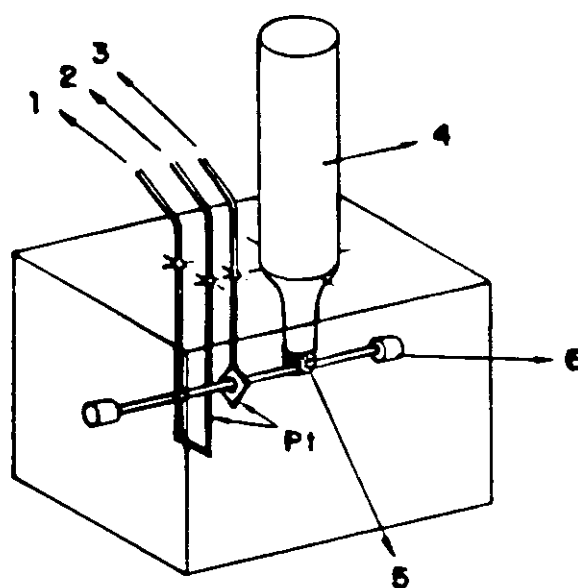


Figura X.4 - Célula amperométrica utilizada para medidas com sistema de injeção em fluxo, onde 1- fio terra; 2-eletrodo de trabalho; 3- eletrodo auxiliar; 4- tubo de polietileno para eletrodo de referência; 5- ponteira de Vycor Fritz e 6- orifício com 1 mm de diâmetro interno⁽⁴⁰⁾.

X.4 - Célula utilizada com reator enzimático com detecção potenciométrica

Utilizou-se a célula de camisa termostatzada mostrado e descrito no item X.1. Para estas medidas substituiu-se a barra magnética pelo reator enzimático conforme mostra a Figura X.5.

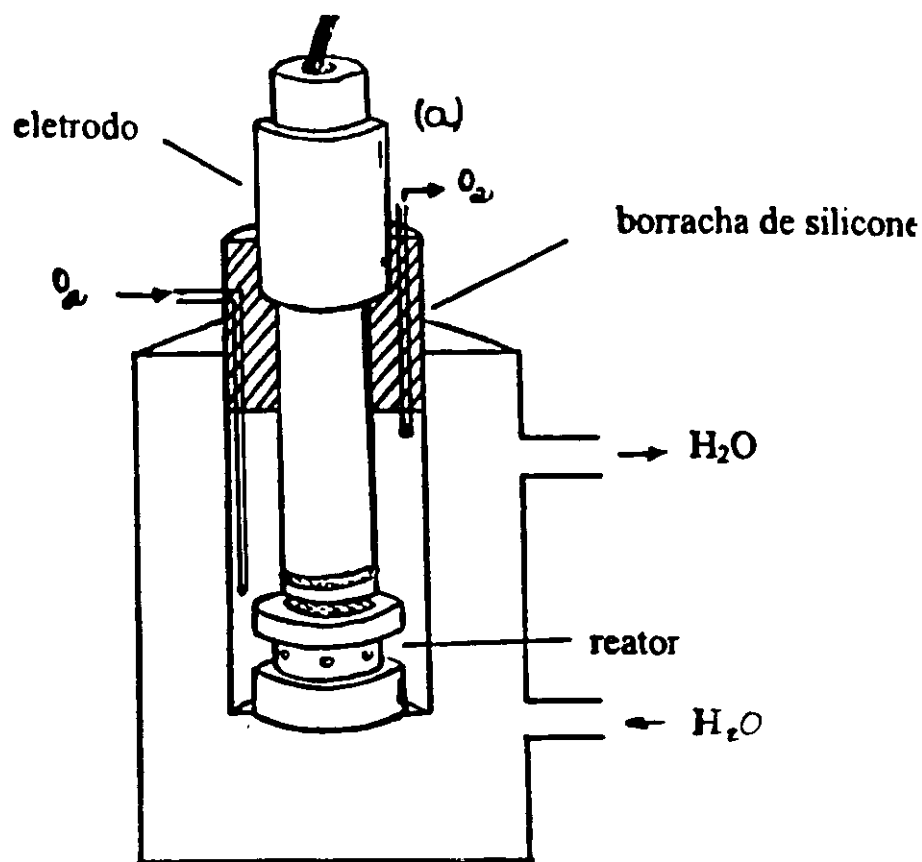


Figura X.5 - Célula utilizada para detecção potenciométrica utilizando reator enzimático contendo o talo, a semente ou a semente germinada da beterraba cortados em pedaços de tamanho variado presas por uma rede de nylon e borracha que agitou a solução.

Capítulo XI

Metodologias Analíticas

XI.1 - Determinação Potenciométrica

Todas as medidas potenciométricas que utilizaram a célula da Figura X.1, foram realizadas à temperatura de 35⁰C, injetando-se 1 mL de solução de ácido oxálico mantida a 35⁰C com auxílio de um banho termostático. A célula da Figura X.2, foi utilizada para fazer a maioria das determinações necessárias para o uso do biossensor. Colocaram-se nesta célula 10 mL de solução tampão e adicionou-se solução estoque de ácido oxálico 0,1 mol/L. As leituras foram realizadas no tempo fixo de 3 minutos para obtenção das curvas de calibração. Para obtenção das curvas cinéticas utilizou-se concentração fixa de ácido oxálico de 1 mmol/L.

Vários parâmetros analíticos foram estudados a fim de se encontrar as melhores condições.

XI.1.1 - Escolha do material para suporte

Para escolha do material para suporte, pesaram-se cerca de 0,4g de cada material que em seguida, foram colocados dentro de um agitador magnético mostrado na Figura IX.6.

O talo e a semente de beterraba foram cortados em pequenos pedaços e condicionados em solução de KCl 1% (m/m) por 15 minutos e colocados, com auxílio de uma pinça, no reator enzimático.

As sementes de beterraba lavadas 5 vezes com água deionizada, foram colocadas sobre o papel de filtro com auxílio de uma pinça, acondicionando em uma placa de Petri. A superfície do papel de filtro foi umedecida com água deionizada previamente fervida e esfriada. Deixou-se em repouso por 2 semanas umidecendo-se, periodicamente, o papel de filtro com água deionizada fervida. Após este período, as sementes germinadas foram cortadas, com uma faca de aço inox lavada com solução de EDTA 2 mmol/L, condicionadas em solução de KCl 1% (m/m) e colocadas no reator enzimático.

XI.1.2 - Escolha do pH de trabalho

Para definir o melhor pH de trabalho para o biossensor potenciométrico, prepararam-se soluções de ácido succínico 0,05 mol/L de pHs de 3,0 a 5,5 ajustados com soluções de NaOH e soluções de H₂SO₄ de pH=2,0 e 2,5.

Para compararem-se as diferenças de pH ótimo das várias fontes de oxalato oxidase, utilizaram-se as fatias de beterraba e as folhas de caruru. As fatias de beterraba e as folhas de caruru foram condicionadas em soluções de diferentes pHs, condicionadas por uma noite à temperatura aproximada de 0°C. A seguir, cada uma destas membranas foi colocada na superfície do eletrodo de gás sensível a CO₂. Utilizando-se a célula termostatizada colocaram-se 10 mL da solução tampão succinato pH=3,5, adicionaram-se 100µL de ácido oxálico 0,1 mol/L e mediu-se o potencial após 3 minutos. A seguir, foram feitas as leituras dos potenciais das soluções de pH=2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 4,5, 5,0 e 5,5.

XI.1.3 - Estudo do efeito da temperatura e da concentração do eletrólito interno

Para realizar o estudo da solução de referência interna a ser utilizada, empregaram-se soluções de bicarbonato de sódio 0,005 mol/L, 0,01 mol/L e 0,1 mol/L contendo 0,5 mol/L de NaCl saturada de AgCl variando-se as temperaturas de 25, 30 e 40°C.

Utilizando-se a solução de referência interna de bicarbonato de sódio 0,01mol/L com 0,5 mol/L de NaCl e do talo de beterraba com enzima imobilizada em tecido vegetal e tratada com glutaraldeído, fez-se a curva de calibração do biossensor com 10 mL de solução de tampão citrato 0,05 mol/L pH=4,0, adicionando-se solução estoque de ácido oxálico 0,1 mol/L utilizando a célula da Figura X.2 variando a temperatura em 25, 30 e 35°C.

XI.2 - Determinação Amperométrica

XI.2.1 - Estudos eletroquímicos

Colocaram-se 5 mL de solução tampão succinato 0,1 mol/L na célula representada na Figura X.3. Borbulhou-se nitrogênio por cerca de 10 minutos e, utilizando eletrodo quimicamente modificado, obtiveram-se voltamogramas cíclicos na faixa de potencial de -0,3 a +0,3 V vs. ECS à 25°C. As curvas de calibração foram obtidas fixando-se os potenciais em -50 mV e +60 mV para os biossensores com mediadores azul de metileno e azul de meldola, respectivamente. As soluções estoques de ácido oxálico foram adicionadas em pequenas quantidades com auxílio de micropipetas de volume regulável de 5 a 50 µL e de 40 a 200 µL.

Para a escolha do pH ótimo dos biossensores amperométricos, utilizaram-se soluções de ácido succínico 0,1 mol/L com pH's ajustados por soluções de NaOH e H₂SO₄ em 4,0, 3,5, 4,5, 3,0, 5,5, 2,5 e 2,0 estudados nesta sequência.

XI.2.2 - Análise por injeção em fluxo

O sistema por injeção em fluxo (FIA), acoplado a célula amperométrica da Figura X.4 é representado esquematicamente pela Figura XI.1.

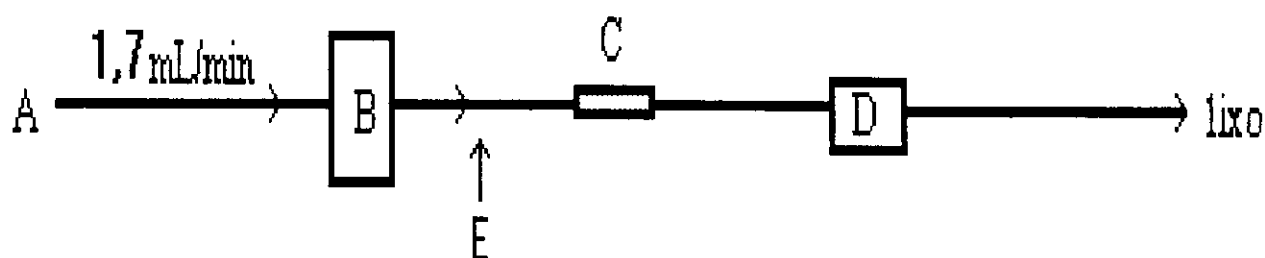


Figura XI.1 - Esquema do sistema de injeção em fluxo utilizado onde : A= carregador (tampão succinato 0,05 mol/L, pH=3,5 com EDTA 1 mmol/L)

B= bomba peristáltica

C= reator enzimático

D= célula de detecção amperométrica

E= injetor do sistema de injeção em fluxo utilizado

Para injeção da solução de ácido oxálico, foi empregado um “loop” de 110 μL no injetor automático. A detecção do produto (H_2O_2) foi realizada aplicando-se potencial de +0,7 V.

Capítulo XII

Efeito das diferentes imobilizações da enzima no biossensor potenciométrico

XII.1 - Escolha da célula utilizada

A célula da Figura X.1 não permitia obter estabilidade suficiente pois, seu sistema de termostatização oscilava em quase 1°C , além de apresentar problemas de formação de bolhas na superfície do biossensor, o que acarretava erros nas medidas obtidas, que se manifestavam na forma de oscilações nos valores de pCO_2 e do rompimento da membrana do eletrodo de CO_2 , não permitindo seu uso por tempo prolongado.

Para eliminar estes problemas, construiu-se uma célula de camisa termostatizada através de um banho termostático (Figura X.2) que permitiu um controle de temperatura mais eficiente. Com a agitação magnética constante, previniu-se e evitou-se a formação de bolhas na superfície do biossensor além de homogeneizar a solução analisada.

A enzima, oxalato oxidase, necessita das moléculas de oxigênio comoceptor de elétrons para realizar a sua catálise. Devido ao forte poder de oxidação da molécula de oxigênio, esta reação catalisada é quimicamente irreversível. Como a flutuação da concentração de oxigênio na solução constitui em um fator limitante desta reação enzimática⁽⁴¹⁾, o oxigênio foi borbulhado na solução fazendo com que houvesse maior formação de CO_2 detectável, como mostra a Figura XII.1.

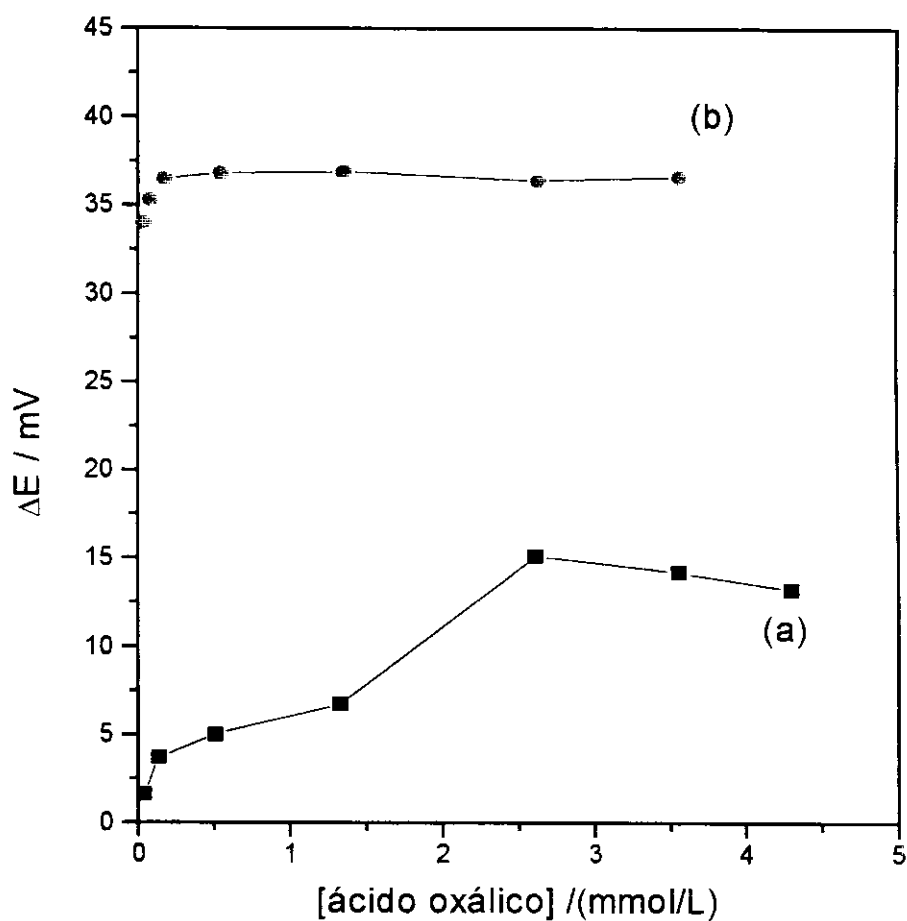


Figura XII.1 - Efeito do gás oxigênio no sistema utilizado. (a) Curva obtida sem borbulhamento de oxigênio no sistema; (b) Curva obtida com o borbulhamento de oxigênio na solução analisada.

Para evitar interferências e erros nas medidas, principalmente de CO₂ do ar atmosférico, que se manifestam na forma de oscilações dos valores de potenciais, o oxigênio recebeu um tratamento prévio com solução saturada de Ba(OH)₂.

XII.2 - Escolha do material para suporte

Tecidos biológicos como plantas e tecidos animais têm sido utilizados para fabricação de biossensores por conterem enzimas⁽⁴²⁾. Sabe-se que a oxalato oxidase está presente em várias plantas como: cevada, caruru, beterraba, entre outros e que nestes meios, por ser o ambiente natural, esta enzima, apresenta-se no seu estado mais estável. Assim, aproveitando-se deste fato, utilizou-se um destes vegetais como suporte para imobilização enzimática. Escolheu-se a beterraba vermelha (*Beta vulgaris rapacea*) devido a sua disponibilidade no mercado, pela estabilidade apresentada pela enzima e pela grande resistência à inibições causadas por alguns sais em altas concentrações⁽⁴³⁾.

A beterraba constitui-se de folhas, caule e raiz. Dentre estes, a possibilidade de usar as folhas foi descartada devido a facilidade de degradação. Visto que, os trabalhos publicados, com a oxalato oxidase de beterraba utilizaram o caule para extrair a enzima^(43,44), estudou-se o emprego do caule, da semente e da semente germinada.

A Figura XII.2 mostra os resultados obtidos utilizando-se estes materiais como fonte enzimática.

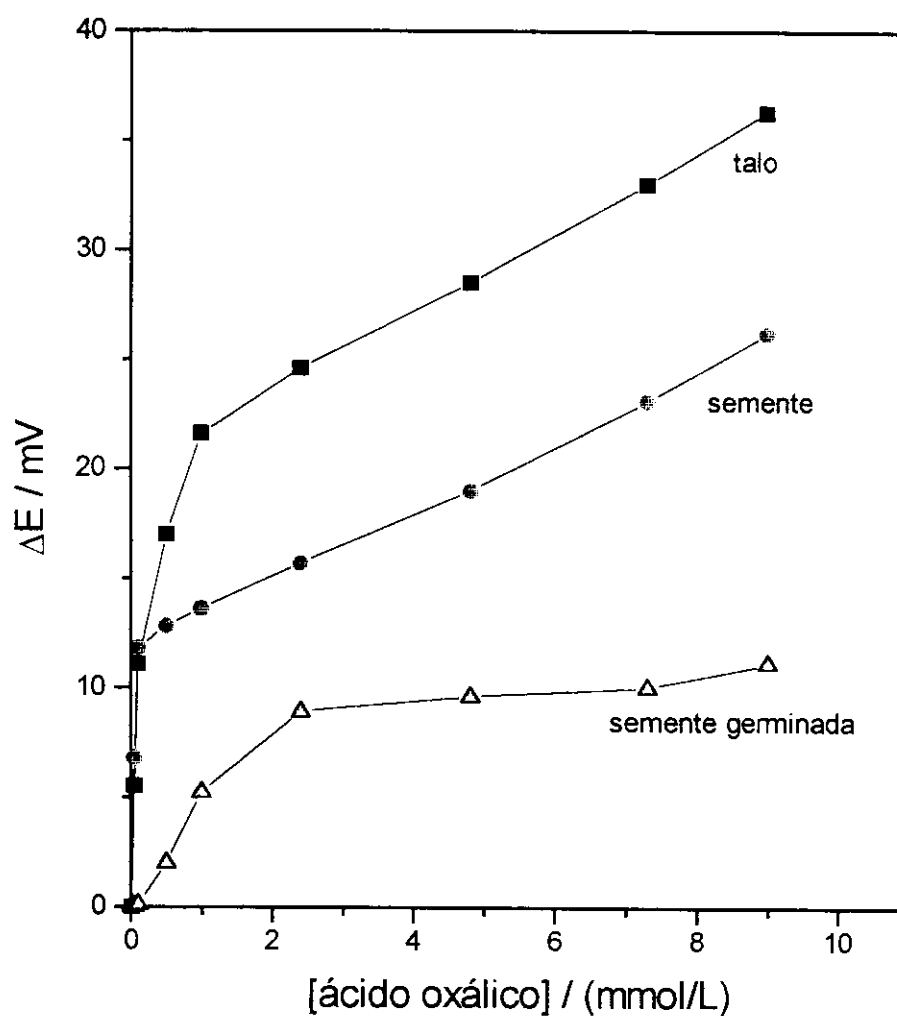


Figura XII.2- Curvas obtidas utilizando o caule (talo) da beterraba, a semente e a semente germinada como fonte de oxalato oxidase. Com tampão citrato 0,05 mol/L pH=4,0 contendo 1 mmol/L de EDTA, T=30°C e tempo de leitura fixada em 3 min.

O talo de beterraba apresentou maior variação de potencial (ΔE), comprovando ter maior atividade e podendo ser facilmente adaptado para ser colocado diretamente sobre a superfície do eletrodo. Assim, foi necessário cortar o talo de beterraba numa espessura tal que permitisse obter estabilidade mecânica e um bom tempo de resposta⁽⁴⁵⁾. Com auxílio de uma lâmina de aço inoxidável, cortou-se manualmente o talo em fatias o mais fino possível. Para evitar que haja algum tipo de contaminação de íons metálicos pela lâmina, lavou-a com solução de EDTA 2 mmol/L.

XII. 3 - Escolha da enzima comercialmente disponível

A oxalato oxidase EC1.2.3.4, encontra-se comercialmente disponível sob duas formas. Uma, na forma purificada, extraída da cevada, contendo 0,8U/mg, e a outra, na forma de “kit” enzimático para análise de oxalato na urina, cujo frasco contém 3U/mL de oxalato oxidase e 100U/mL de peroxidase extraída de rábano. Ambas, são encontradas na forma de pó liofilizado para serem reconstituídos em solução tampão succinato 0,05mol/L, pH=3,8.

Após a reconstituição da enzima, condicionaram-se as fatias de beterraba imobilizando-as conforme descrito no item VIII.1.2. Os biossensores construídos com estas fatias de beterraba, foram utilizados para obtenção das curvas cinéticas mostradas na Figura XII.3.

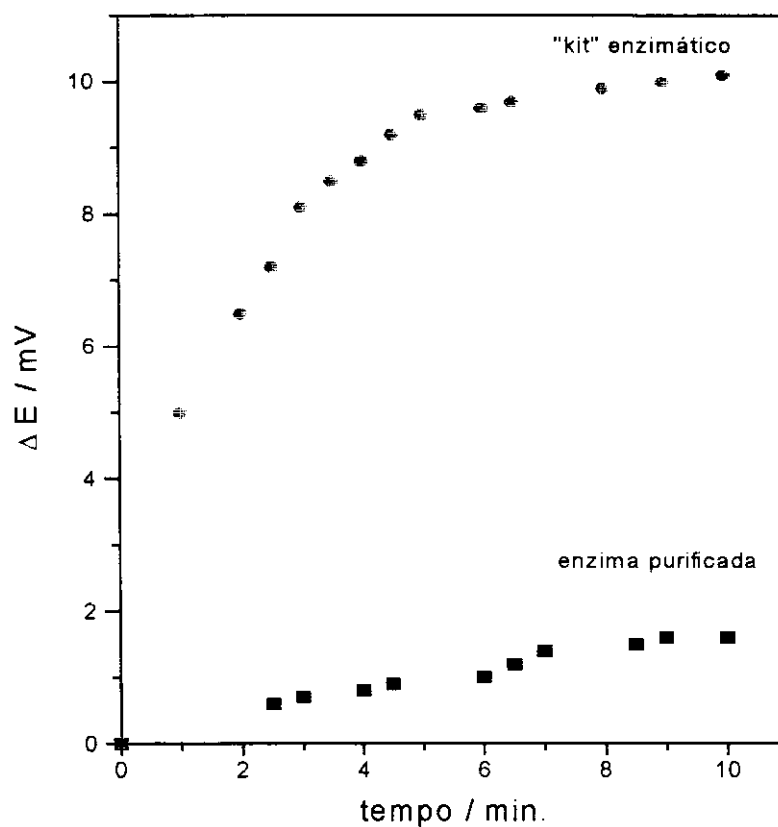
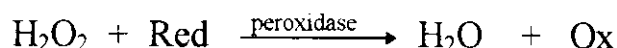


Figura XII.3 - Curvas cinéticas obtidas com fatias de talos de beterraba com as duas formas de oxalato oxidase imobilizadas. Concentração de ácido oxálico de 0,45mmol/L com 1mmol/L de EDTA em tampão fosfato 0,05mol/L.

(a) "kit"Sigma de oxalato oxidase 3U/mL e peroxidase 100U/mL

(b) Sigma oxalato oxidase purificada (0,8 U/mg) extraída da cevada, total de 10U/mL no frasco.

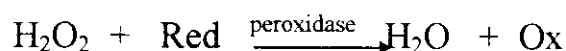
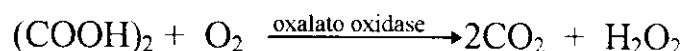
Pode-se observar que, apesar da enzima purificada possuir maior atividade, a curva cinética obtida com a enzima do “kit” apresenta maior variação de potencial. Isto é explicado pela presença da enzima peroxidase neste “kit”. A peroxidase, catalisa a reação



onde: Red = agente redutor

Ox = produto oxidado

Portanto, quando associada com a reação catalisada pela oxalato oxidase, tem-se como resultado um deslocamento do equilíbrio da reação através de maior consumo de oxalato provocado pelo consumo de um dos produtos desta reação, o H_2O_2 , aumentando conseqüentemente a formação de CO_2 .



XII.4 - pH da solução tampão

De acordo com a literatura, ref. 43, 46- 49, verificou-se que a oxalato oxidase pode ser extraída de diversas fontes vegetais e possuem diferentes faixas de pH ótimo. Conforme mostram as Figuras XII.4 e XII.5, verificou-se que a beterraba apresenta uma faixa de pH ótimo entre 3,0 a 4,5 e o caruru entre 2,5 a 3,5. Em se tratando de um biossensor potenciométrico, o pH=4,0 é compatível com o sensor de CO_2 utilizado. Em muitos casos, a solução de

referência interna deste eletrodo varia de acordo com dois fatores: a velocidade de difusão do CO_2 no filme da solução interna do eletrodo e da velocidade de difusão do gás na solução de amostra externa ao eletrodo. Estes efeitos, dependerão do pH da solução amostra. Se esta solução é mais alcalina, o pH do filme da solução interna é alto (acima de 7,0) e a velocidade de difusão do gás, lenta. Caso a solução seja mais ácida, a difusão do gás aumenta e o pH resultante na solução interna do eletrodo ficará abaixo de 7,0 ⁽⁵⁰⁾. Isto explica o fato de que nos valores de pH acima ou abaixo destes, observa-se um declínio nas curvas.

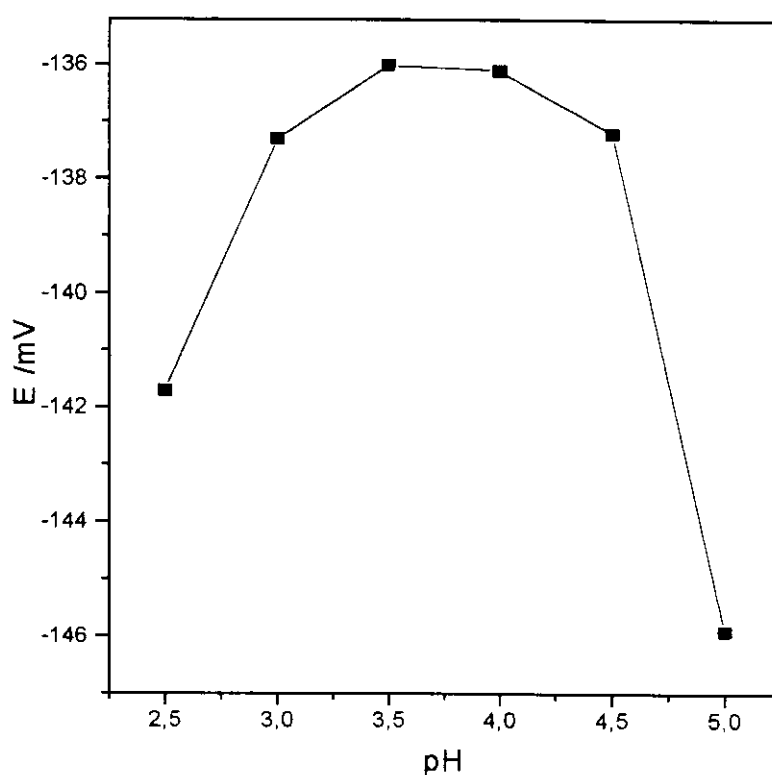


Figura XII.4 - Determinação de pH ótimo para beterraba. Potenciais obtidos em tempos de leitura $t=3\text{min}$. Utilizando solução ácido oxálico 1mmol/L em tampão succinato $0,05\text{ mol/L}$ com $\text{pH}=3,0$ a $5,5$ ajustados com solução de NaOH e em solução diluída de H_2SO_4 a $\text{pH}=2,0$ e $2,5$.

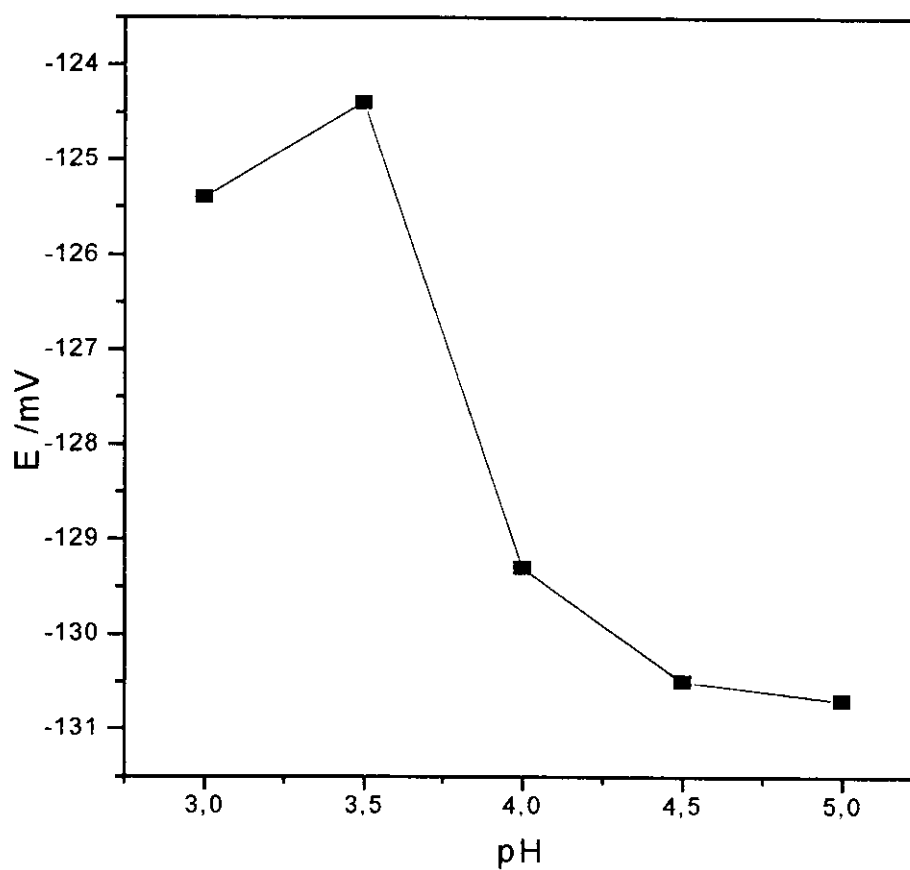


Figura XII.5 - Determinação de pH ótimo para folhas de caruru utilizando sensor potenciométrico. Potenciais obtidos no tempo de leitura de 3 minutos utilizando solução de ácido oxálico 1mmol/L em tampão succinato a pH=3,0 a 5,5 ajustados com solução de NaOH e em solução diluída de H_2SO_4 a pH=2,0 e 2,5.

A Tabela XII.1 mostra a comparação dos valores ótimos de pH quando se utiliza beterraba ou caruru.

Tabela XII.1: Tabela comparativa dos valores de pH encontrados experimentalmente pelo método potenciométrico e daqueles apresentados pela literatura.

	beterraba	caruru
pH experimental	3,0 - 4,5	2,5 - 3,5
pH da literatura	4,0 ^(43,44) , 4,2 ⁽⁴³⁾ e 4,5 ⁽⁵¹⁾	4,5 ⁽⁴⁸⁾

Nota-se que há uma discordância entre os valores de pH ótimo encontrados neste trabalho com os da literatura. Provavelmente, um dos principais fatores seria a diferença de nutrientes e sais existentes entre solos de regiões diferentes.

XII.5 - Tampão Utilizado

Os tampões mais utilizados para análise de oxalato são os tampões succinato e citrato, na concentração de 0,05 mol/L. Entre estes, escolheu-se o tampão citrato para a beterraba e o tampão succinato, para a cevada e o caruru, devido aos melhores resultados obtidos.

Para melhorar a sensibilidade do biossensor potenciométrico, estudou-se o efeito dos ativadores mais conhecidos para oxalato oxidase, o EDTA e a 8-hidroxiquinolina.

As Figuras XII.6 e XII.7 mostram os resultados obtidos quando se utilizaram as soluções tampões com estes ativadores.

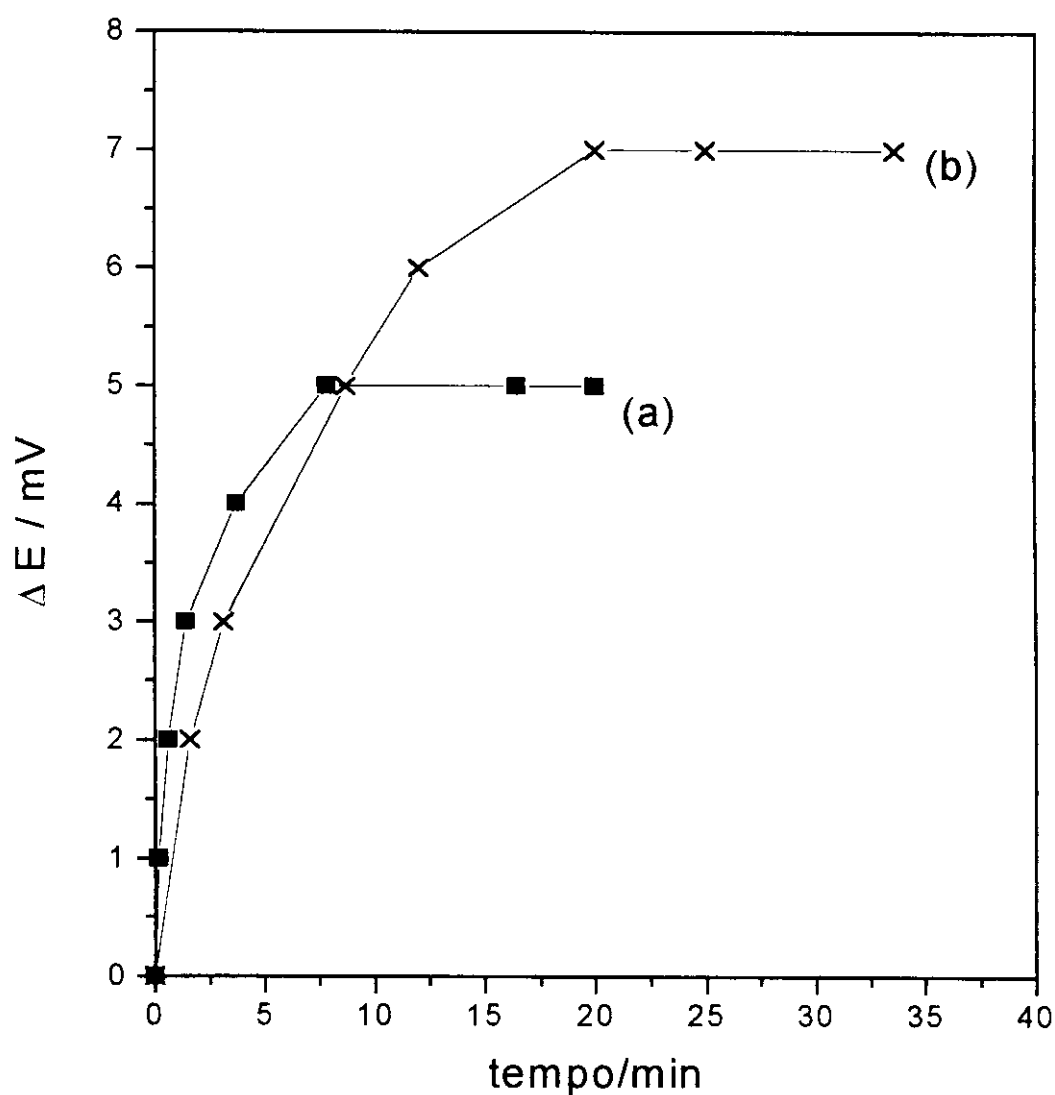


Figura XII.6 - Curvas cinéticas obtidas com talo de beterraba utilizando solução ácido oxálico 1mmol/L em tampão succinato (a) sem EDTA e (b) com 1mmol/L de EDTA .

Observa-se através da Figura XII.6 que há uma melhora considerável na sensibilidade do biossensor com a adição de EDTA na solução, embora a velocidade da reação enzimática diminua.

A Figura XII.7 ilustra as curvas obtidas com as soluções tampão citrato com estes ativadores em separados e com a combinação dos dois.

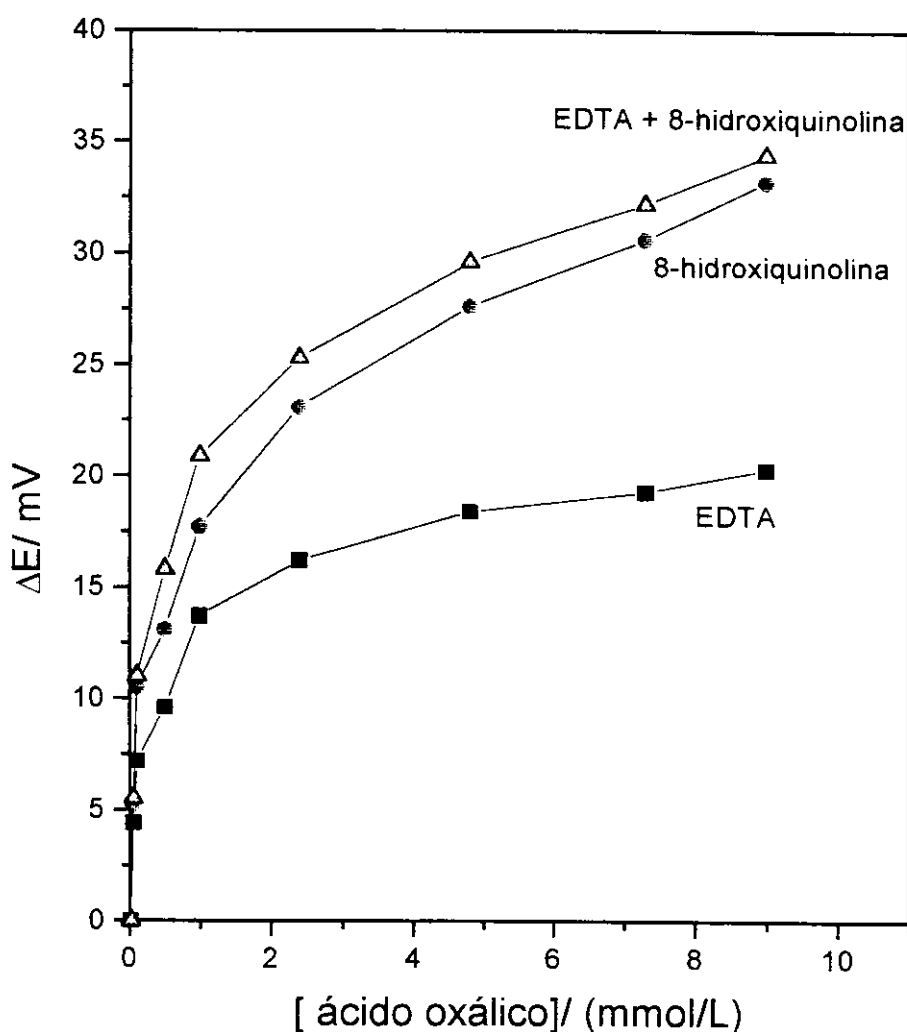


Figura XII.7 - Curvas de calibração obtidas com o biossensor potenciométrico com talo de beterraba com oxalato oxidase imobilizada, utilizando tampão citrato 0,05 mol/L com EDTA 1 mmol/L, com 8-hidroxiquinolina 2 mmol/L e com a combinação dos dois ativadores.

Pode-se concluir que a combinação de 1mmol/L de EDTA e 2mmol/L de 8-hidroxiquinolina favorece a atividade relativa da enzima. Isto se deve provavelmente, à complexação do cálcio e outros íons metálicos presentes que bloqueiam o centro ativo da enzima⁽³⁹⁾.

XII.6 - Estudo do efeito da temperatura

Para determinar a melhor temperatura para o sistema, têm-se que considerar as condições e os limites impostos pelo transdutor utilizado. Assim, estudou-se primeiramente a faixa de temperatura útil do eletrodo de CO₂ e da sua solução de referência interna.

Conforme mostram as Figuras XII.8 e XII.9, houve uma considerável melhora na resposta do eletrodo quando se utilizou solução de bicarbonato 0,01 mol/L como solução de referência interna, confirmando os resultados obtidos por Guilbault e Shu⁽³⁹⁾. O tempo de resposta médio com esta solução, foi de 3 min., a 25^oC e de 2 min., a 30^oC.

A temperatura de 40^oC mostrou-se inadequada para a resposta do eletrodo devido à instabilidade do potencial de leitura, provavelmente devido à alteração na pressão de vapor da solução externa. Este fato limitou então, a temperatura de trabalho para valores inferiores.

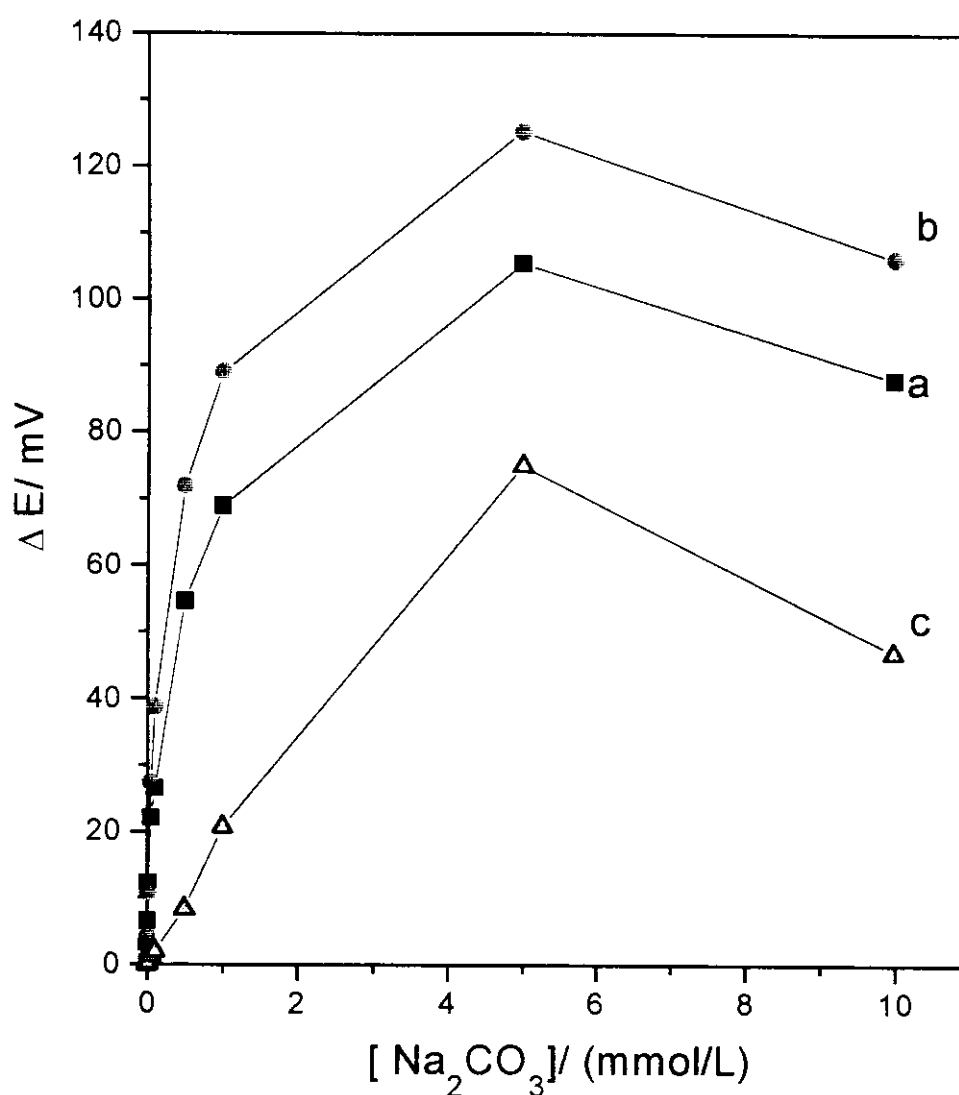


Figura XII.8 - Curvas de calibração obtidas com eletrodo de CO_2 , temperatura de 25°C , utilizando solução padrão de carbonato de sódio. As concentrações de bicarbonato de sódio da solução de referência interna do eletrodo foram: (a) em 5×10^{-3} mol/L, (b) em 0,01 mol/L e (c) em 0,1 mol/L todas com 0,5 mol/L de NaCl.

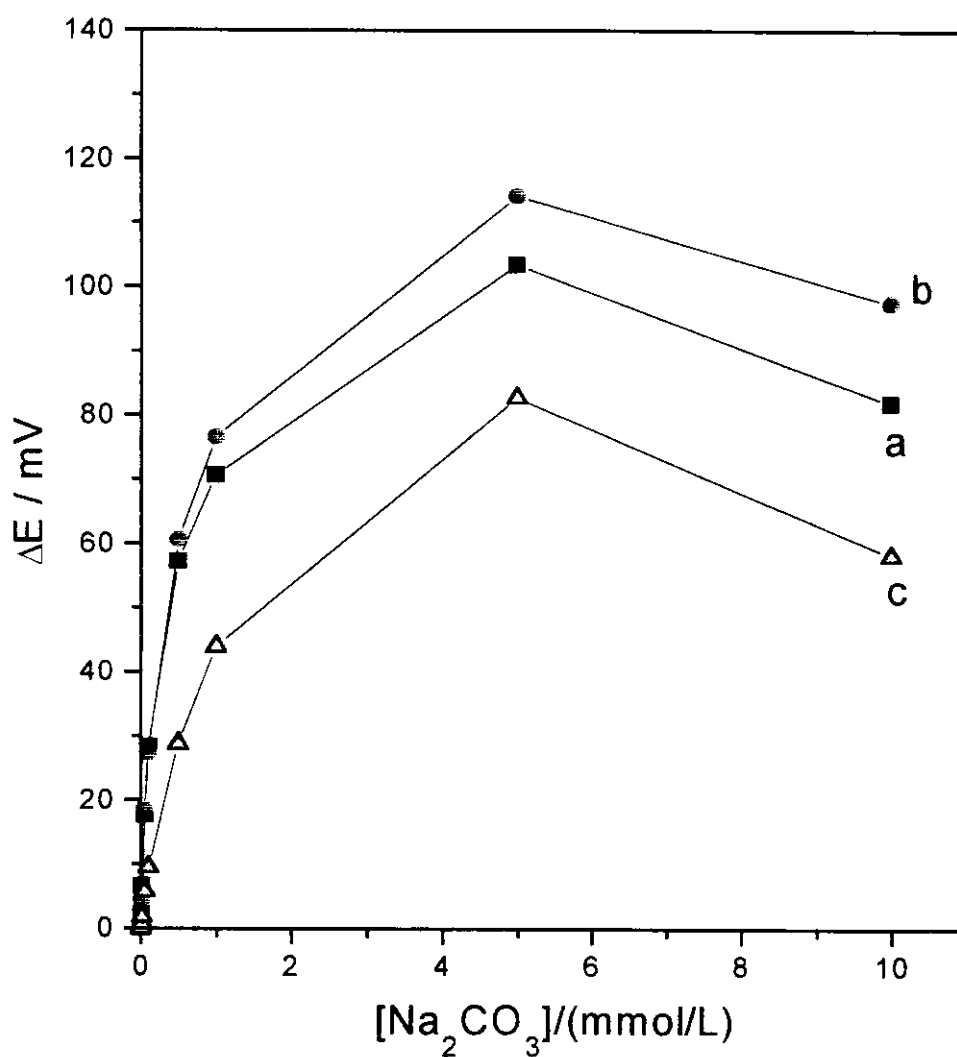


Figura XII.9- Curvas de calibração obtidas com eletrodo de CO₂, a temperatura de 30°C, utilizando solução de carbonato de sódio. As concentrações de bicarbonato de sódio da solução de referência interna do eletrodo foram: (a) 5x10⁻³ mol/L, (b) 0,01 mol/L e (c) 0,1 mol/L todas com 0,5 mol/L de NaCl.

Colocando-se a beterraba na superfície do eletrodo, estudou-se, a temperatura ótima para este sistema através de curvas de calibração obtidas à temperaturas de 25, 30 e 35°C, representadas na Figura XII.10. Pode-se observar que a 35°C houve uma diminuição dos valores da resposta do eletrodo, enquanto que a melhor resposta foi obtida a 30°C.

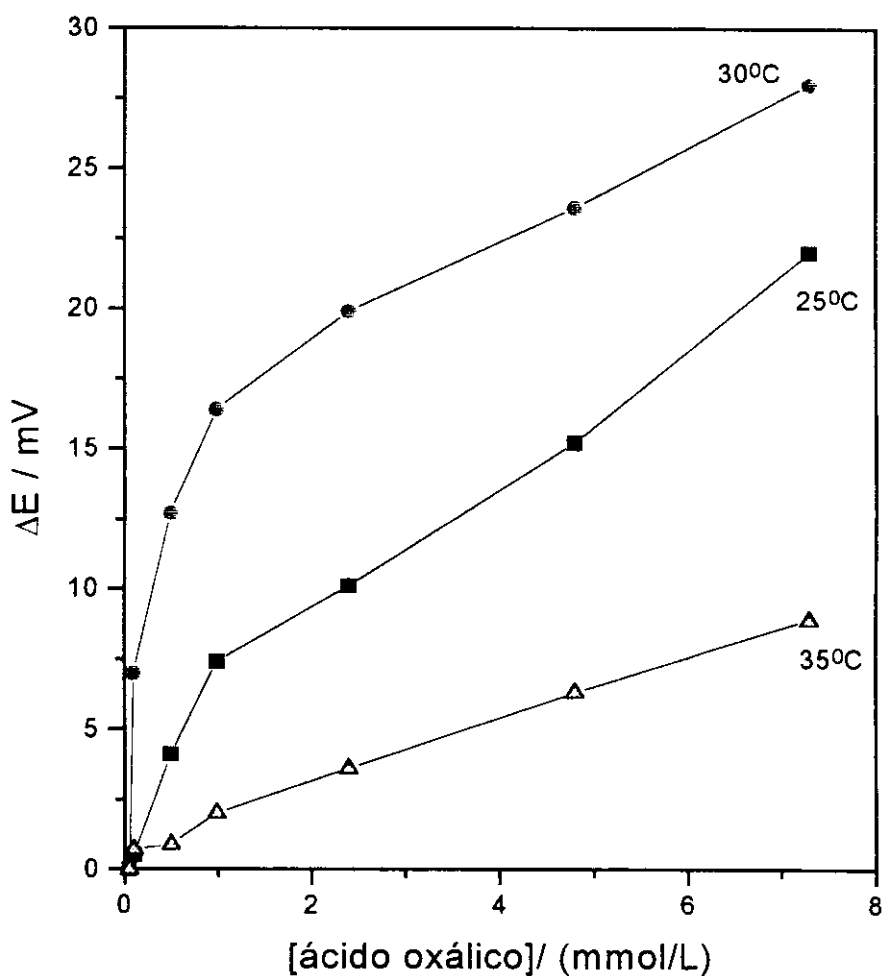


Figura XII.10 - Curvas de calibração obtidas com biossensor potenciométrico de talo de beterraba nas temperaturas de 25, 30 e 35°C utilizando tampão citrato 0,05 mol/L, pH=4,0, e tempo de leitura fixo em 3 minutos e usando como solução de referência interna do eletrodo de CO₂, solução de NaHCO₃ 0,01 mol/L/ NaCl 0,5 mol/L.

XII.7 - Estudo dos efeitos e melhores condições para imobilização via radiação gama

Há dois fatores importantes para serem estabelecidos neste estudo. São eles, a dose de irradiação a que o material será submetido e a temperatura em que este material estará no momento de receber a radiação.

Caso a dosagem da radiação seja alta, esta causará uma redução de 30% ou mais na atividade original da enzima⁽⁵²⁾. Além disso, esta alta dose de radiação pode provocar a decomposição do oxalato através da ruptura da ligação C-C do ânion $C_2O_4^{-2}$, cujo efeito é maior quanto maior a dose de irradiação recebida pelo material⁽⁵³⁾. Sabe-se entretanto que a energia de ativação do etapa de aceleração da decomposição do oxalato irradiado é superior a 1MGy. Portanto, para evitar a ocorrência deste efeito, escolheu-se uma dose bem abaixo deste limite estipulado.

Quanto à temperatura, esta encontra-se diretamente relacionada à dose de irradiação e ao ambiente em que o material se encontra durante o processo de irradiação. No entanto, Doretto et al.⁽²⁶⁾ constataram que quanto menor a temperatura, menor é o prejuízo causado à atividade enzimática provocada pela radiação. Mas, quando se aplica uma dose de irradiação abaixo de 2,7 kGy, esta relação passa a ser o inverso, ou seja, a avaria causada à atividade enzimática é menor quanto maior a temperatura.

A dosagem escolhida neste trabalho foi de 10 kGy (correspondente a 1 Mrad) que é bem menor que a dosagem limite estabelecida para decomposição do analito e maior que 2,7 kGy.

Escolheu-se a temperatura de 0°C para irradiar-se a amostra de beterraba, devido a facilidade de obtenção e manuseio (através da utilização do gelo) e por ser uma temperatura abaixo da temperatura ambiente, onde não há danos à atividade da enzima.

Estabelecidas estas condições, foi necessário escolher os ambientes em que as amostras estariam no momento de receber a radiação gama. A princípio, estudaram-se os comportamentos das curvas cinéticas da enzima oxalato oxidase quando irradiadas em ambientes de ar atmosférico e nitrogênio, e compararam-se os resultados obtidos com os da beterraba não irradiada, mostrada na Figura XII.11.

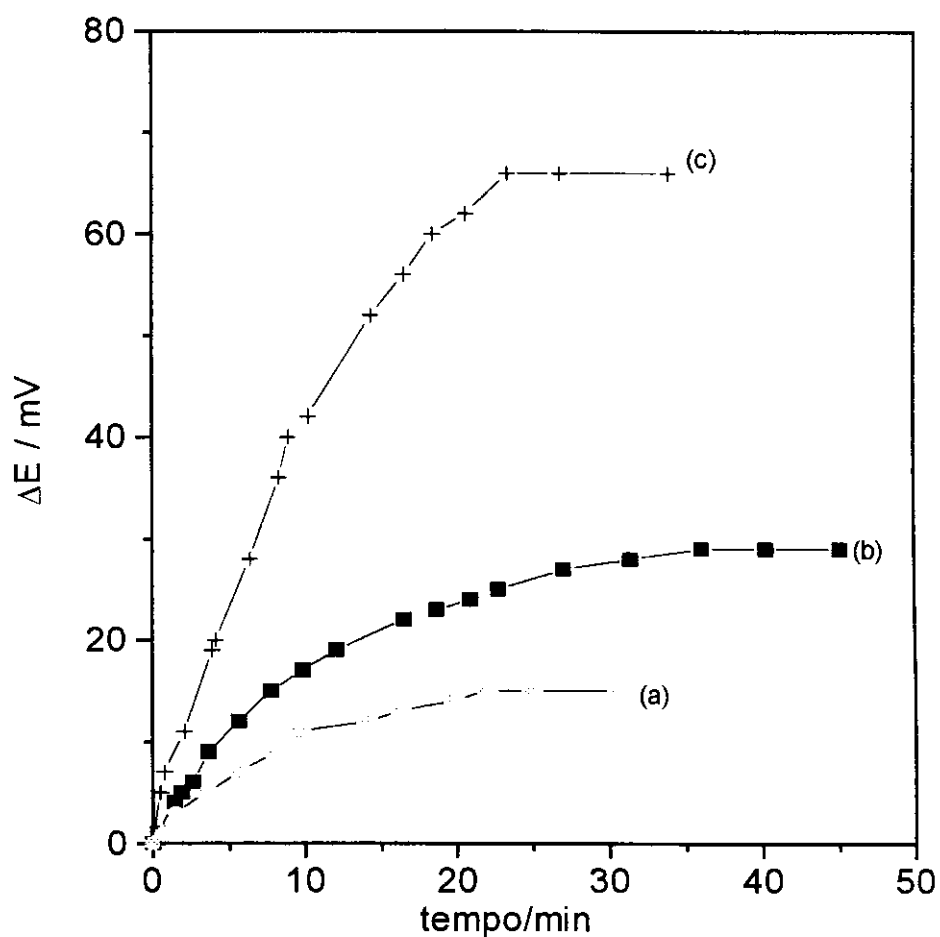


Figura XII.11 - Curvas cinéticas obtidas com as fatias de beterraba: irradiadas em ambiente de (a) ar atmosférico; (c) nitrogênio e (b) não irradiada. Solução de ácido oxálico 5 mmol/L em tampão succinato 0,05 mol/L a pH=3,0. Radiação gama na dose de 10 kGy a 0°C. Curvas obtidas à 35°C com fatias de beterraba após 26 dias da irradiação.

Como pode-se observar, o ambiente de ar atmosférico inibe a atividade da enzima já que esta curva apresenta menor variação de ΔE , produção menor de CO_2 , do que a beterraba não irradiada. Este fato pode ser explicado pela produção de radicais livres⁽⁵⁴⁾. Os radicais livres, gerados durante a irradiação gama, podem formar ligações entrecruzadas com diferentes moléculas, tal como o suporte. No ar atmosférico, o oxigênio está presente em grandes quantidades e sendo bastante reativo, ele rapidamente combina com os radicais livres, impedindo que estes reajam com as moléculas presentes e formem ligações entrecruzadas. Assim, é quase certo que quando a enzima é irradiada, esta forma, num processo primário, radicais através da perda de um átomo de hidrogênio. Portanto, dependendo da concentração de oxigênio presente no momento da irradiação, este se liga ao radical antes que qualquer processo tenha lugar⁽⁵⁵⁾.

Já o ambiente de nitrogênio, apresentou maior ΔE pois embora seja comercial, possui menor quantidade de oxigênio que o ar atmosférico.

Em seguida, continuaram-se os estudos de ambientes de irradiação em vácuo, nitrogênio e argônio, como mostra a Figura XII.12.

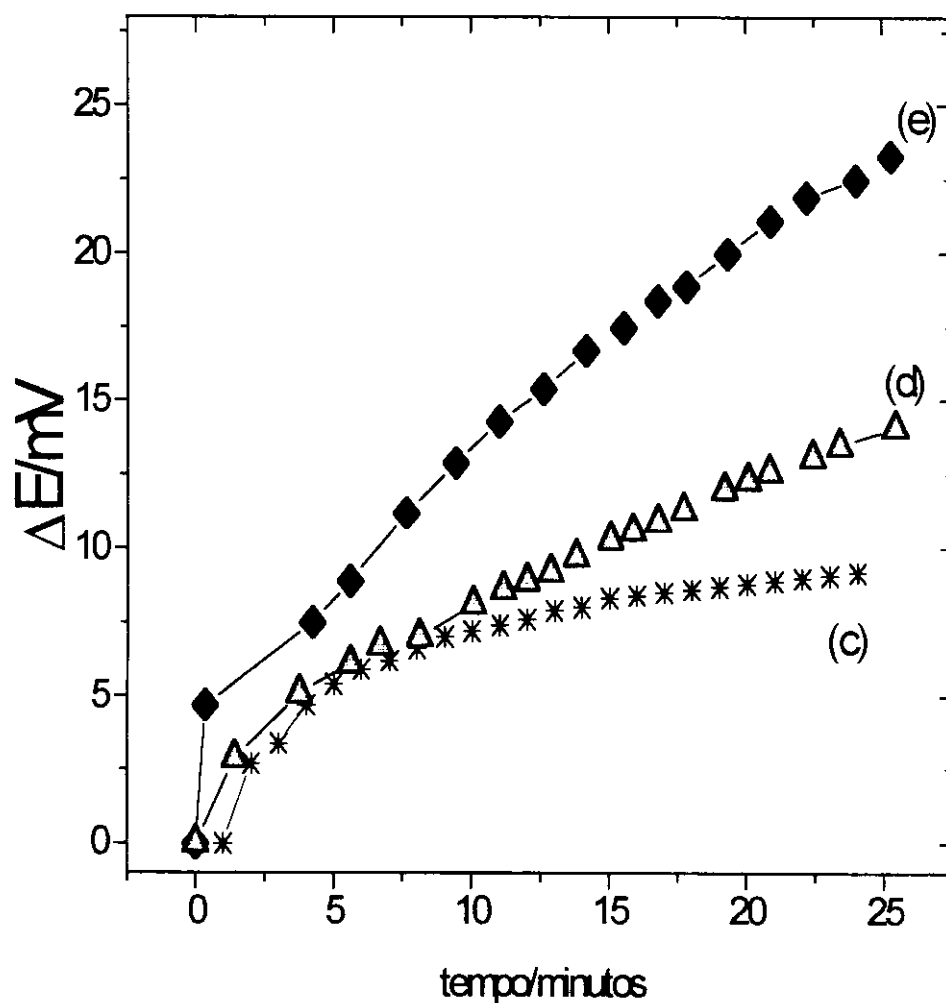


Figura XII.12 - Curvas cinéticas obtidas com fatias de beterraba irradiadas em ambiente de (c) nitrogênio, (d) vácuo e (e) argônio. Solução de ácido oxálico 1 mmol/L em tampão succinato 0,05 mol/L pH=3,0 com 1 mmol/L de EDTA. Radiação gama a dose de 10 kGy a 0°C. Curvas obtidas à 30°C com fatias de beterraba após 20 dias de irradiação.

Conforme mostrado na Figura XII.12, o ambiente de nitrogênio, por não ser totalmente livre de oxigênio, mostra uma curva com menor variação de potencial, o ambiente de vácuo, embora seja melhor que o de nitrogênio, possui uma pequena quantidade de oxigênio que inibe a formação de ligações intermoleculares. Observa-se então que pelo comportamento da curva obtida como fatia de beterraba irradiada em ambiente de argônio, que neste meio houve melhor remoção de oxigênio.

As diferenças de ΔE apresentadas pelas curvas obtidas no ambiente de nitrogênio nas Figuras XII.11 e XII.12 são explicadas pelas diferentes concentrações de ácido oxálico em cada uma delas e do tempo após a irradiação de cada uma delas.

Observaram-se pelos dias transcorridos que as fatias de beterrabas irradiadas mantinham suas características físicas inalteradas por um período de tempo superior a 4 meses, enquanto que as não irradiadas imobilizadas com glutaraldeído permaneceram inalteradas fisicamente por 2 meses e sem glutaraldeído apresentou uma coloração enegrecida nesse mesmo período de 2 meses. Assim, estudou-se o efeito da radiação gama sobre fatias de beterraba em período de 2 meses com intervalos de 1 semana comparando os resultados obtidos com as fatias de beterraba sob diversas formas de imobilização com e sem irradiação. Compararam-se então, os valores da variação do potencial obtidos a 3 minutos, para oxalato oxidase imobilizadas em tecidos vegetais (fatia do talo de beterraba), imobilizada por método de suporte com ligação covalente (fatia do talo de beterraba com enzima purificada), imobilizada por método de ligação química com o suporte utilizando reagentes polifuncionais (fatia do talo de beterraba com enzima purificada e glutaraldeído) e a imobilizada em tecidos vegetais com reagente polifuncional (fatia do talo de beterraba com glutaraldeído) conforme demonstrado nas Figuras XII.13(a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) e (h).

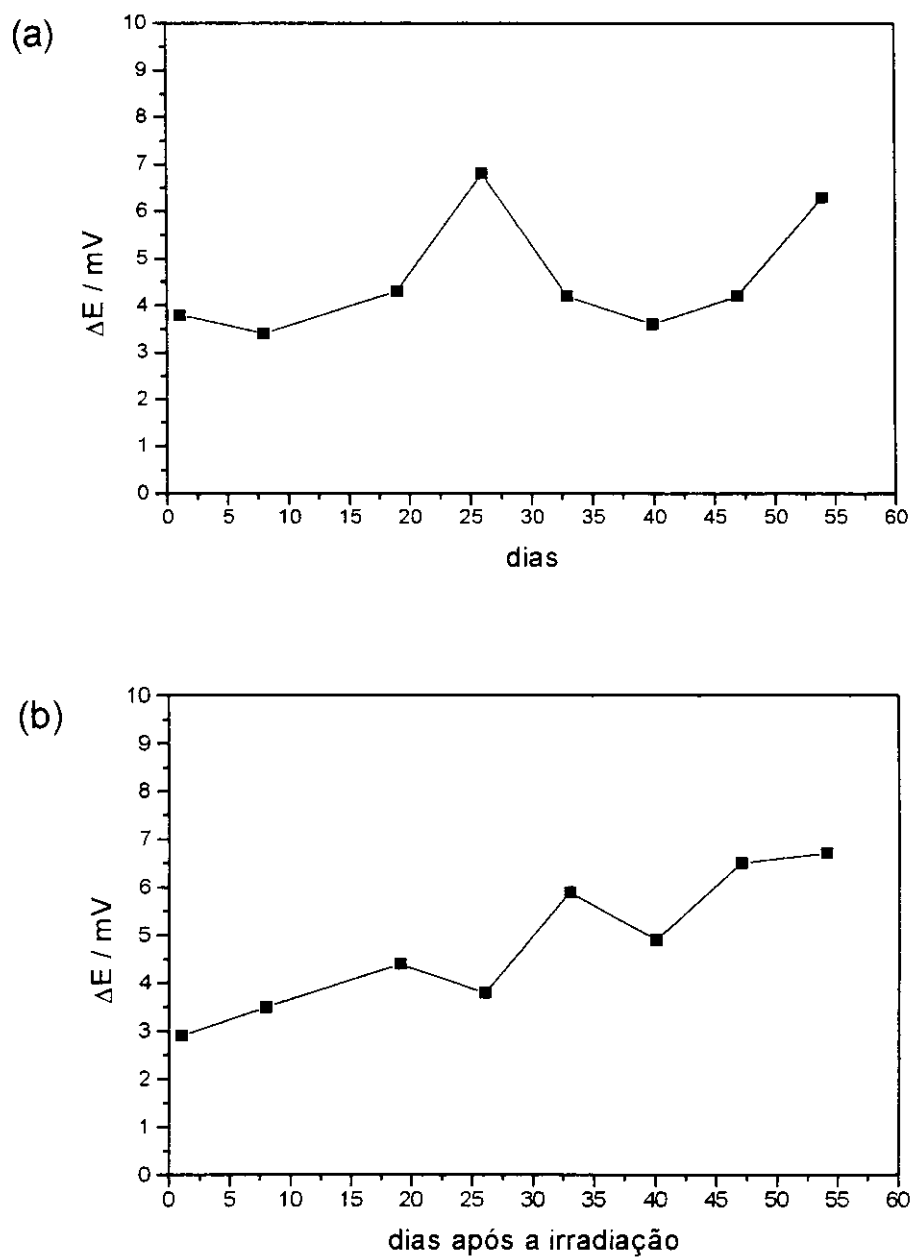


Figura XII.13(a) e (b) - Comportamento da enzima oxalato oxidase imobilizada sob métodos variados num período de 54 dias onde (a) oxalato oxidase imobilizada em tecido vegetal, (b) oxalato oxidase imobilizada em tecido vegetal submetida a radiação gama. Solução de ácido oxálico 1 mmol/L em tampão citrato 0,05 mol/L a pH=4,0 com 1 mmol/L de EDTA e 2 mmol/L de 8-hidroxiquinolina. Temperatura de 30°C.

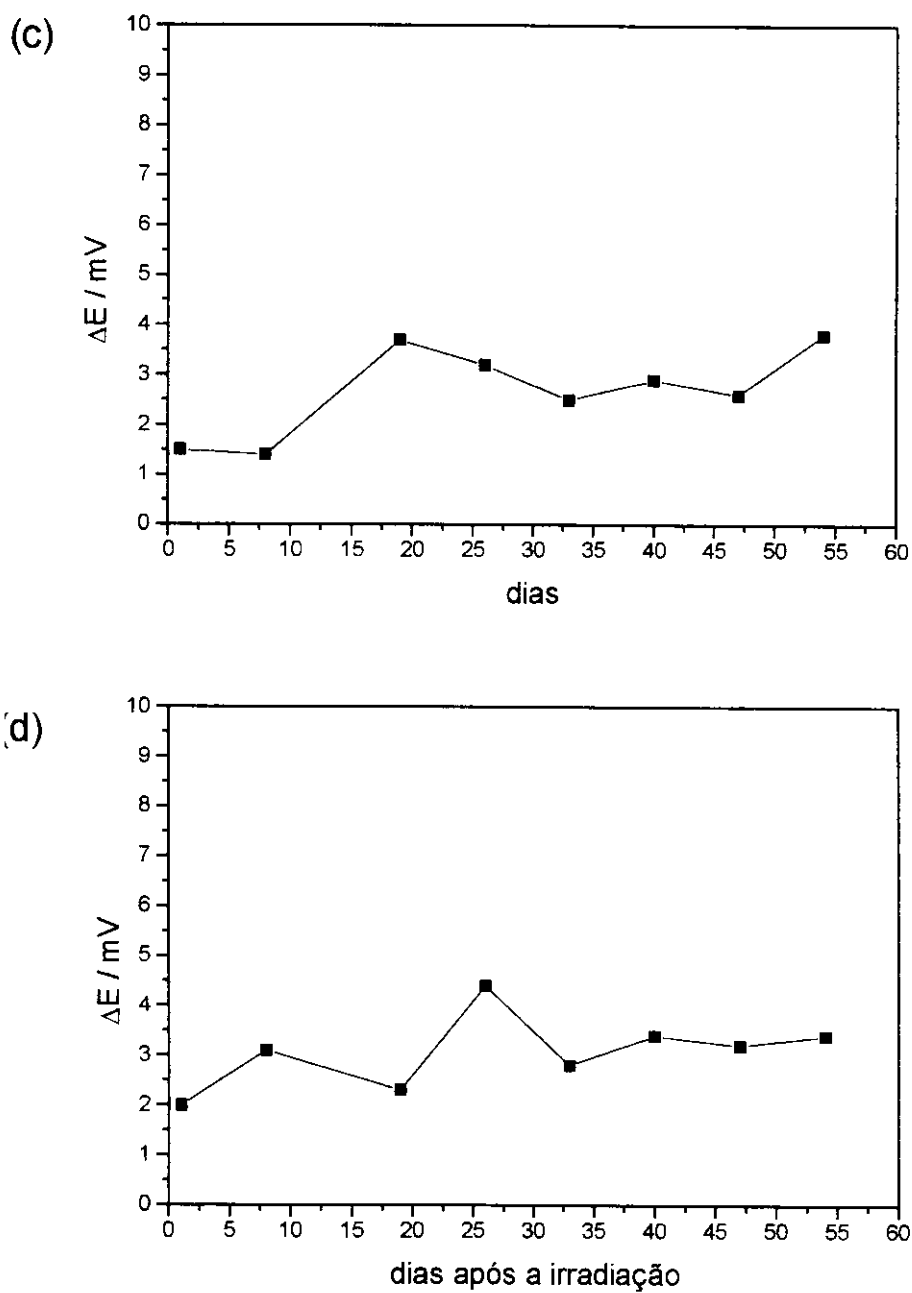


Figura XII.13(c) e (d) - Comportamento da enzima oxalato oxidase imobilizada sob métodos variados num período de 54 dias onde (c) oxalato oxidase imobilizada em tecido vegetal e reagente polifuncional, (d) oxalato oxidase imobilizada em tecido vegetal, reagente polifuncional e radiação gama. Solução de ácido oxálico 1 mmol/L em tampão citrato 0,05 mol/L pH=4,0 com 1 mmol/L de EDTA e 2 mmol/L de 8-hidroxiquinolina. Temperatura de 30°C.

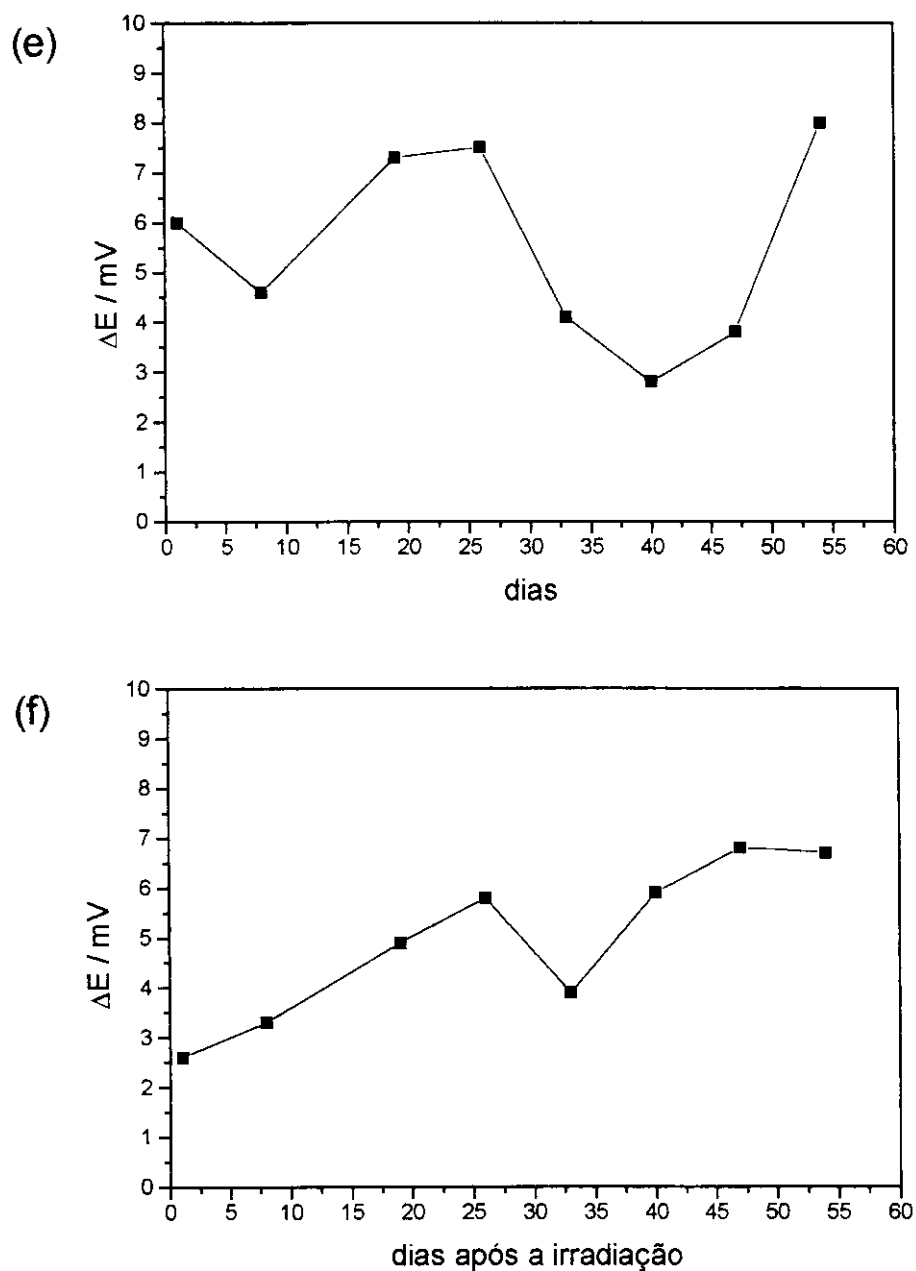


Figura XII.13(e) e (f) - Comportamento da enzima oxalato oxidase imobilizada sob métodos variados num período de 54 dias onde (e) oxalato oxidase purificada imobilizada pelo método de suporte com ligação covalente, (f) oxalato oxidase purificada imobilizada pelo método de suporte com ligação covalente e radiação gama. Solução de ácido oxálico 1 mmol/L em tampão citrato 0,05 mol/L a pH=4,0 com 1 mmol/L de EDTA e 2 mmol/L de 8-hidroxiquinolina. Temperatura de 30°C.

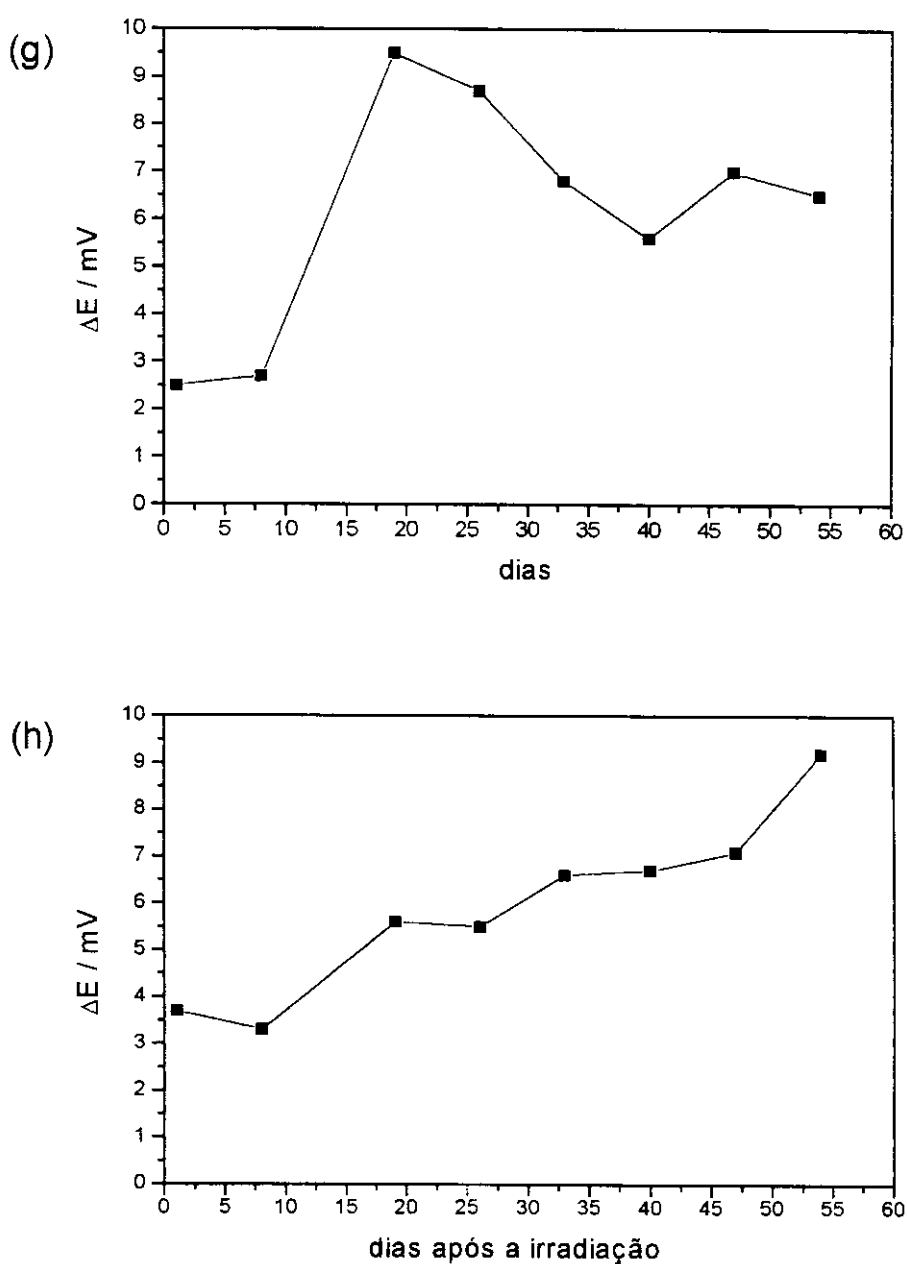


Figura XII.13(g) e (h) - Comportamento da enzima oxalato oxidase imobilizada sob métodos variados num período de 54 dias onde (g) oxalato oxidase purificada imobilizada pelo método de ligação química com o suporte utilizando reagente polifuncional e (h) oxalato oxidase purificada imobilizada pelo método de ligação química com o suporte utilizando reagente polifuncional e radiação gama. Solução de ácido oxálico 1 mmol/L em tampão citrato 0,05 mol/L a pH=4,0 com 1 mmol/L de EDTA e 2 mmol/L de 8-hidroxiquinolina. Temperatura de 30°C.

Como pode-se constatar, pela Figura XII.13, enquanto as fatias não irradiadas apresentam atividade enzimática máxima transcorridos 20 a 30 dias, as irradiadas tem essa atividade máxima após 50 dias, aproximadamente. Isso explica o comportamento da curva cinética obtida para a fatia de beterraba sem a irradiação comparadas com a irradiada na Figura XII.11. Pode-se ver também, pelo gráfico XII.13(h) que a resposta obtida após 20 dias da irradiação, em geral, é menor que as obtidas após 26 dias. O que explicaria as diferenças observadas nas curvas obtidas com o nitrogênio nas Figuras XII.11 e XII.12.

O uso de glutaraldeído provocaria diminuição da resposta, caso não houvesse adição de oxalato oxidase purificada. Possivelmente, porque sendo um polímero, o glutaraldeído forma mais ligações entrecruzadas, acarretando uma camada que não permitiria fácil acesso do substrato à enzima. Então, com o “reforço” recebido através da enzima purificada, a resposta aumentaria.

Uma das desvantagens observadas é a perda de sensibilidade da enzima quando submetida a irradiação, obtendo-se curvas cinéticas com menor intensidade no valor do potencial. A principal vantagem está no maior tempo de vida útil da enzima, permitindo sua utilização por um período mais prolongado, necessitando apenas conservação em tampão citrato 0,05 mol/L na temperatura aproximada de 0°C, o que pode ser significativo numa relação custo/benefício.

Dando continuidade ainda, ao estudo do ambiente de irradiação, irradiaram-se as fatias de beterraba em meio aquoso. Neste caso, utilizou-se o tampão citrato como meio a ser comparado com as curvas cinéticas obtidas com as fatias de beterraba irradiadas em ambiente de argônio. Conforme mostra a Figura XII.14(a), (b) e (c), há uma diminuição da atividade enzimática quando a irradiação se dá em meio de tampão, exceto para a fatia com enzima purificada imobilizada com glutaraldeído e radiação gama.

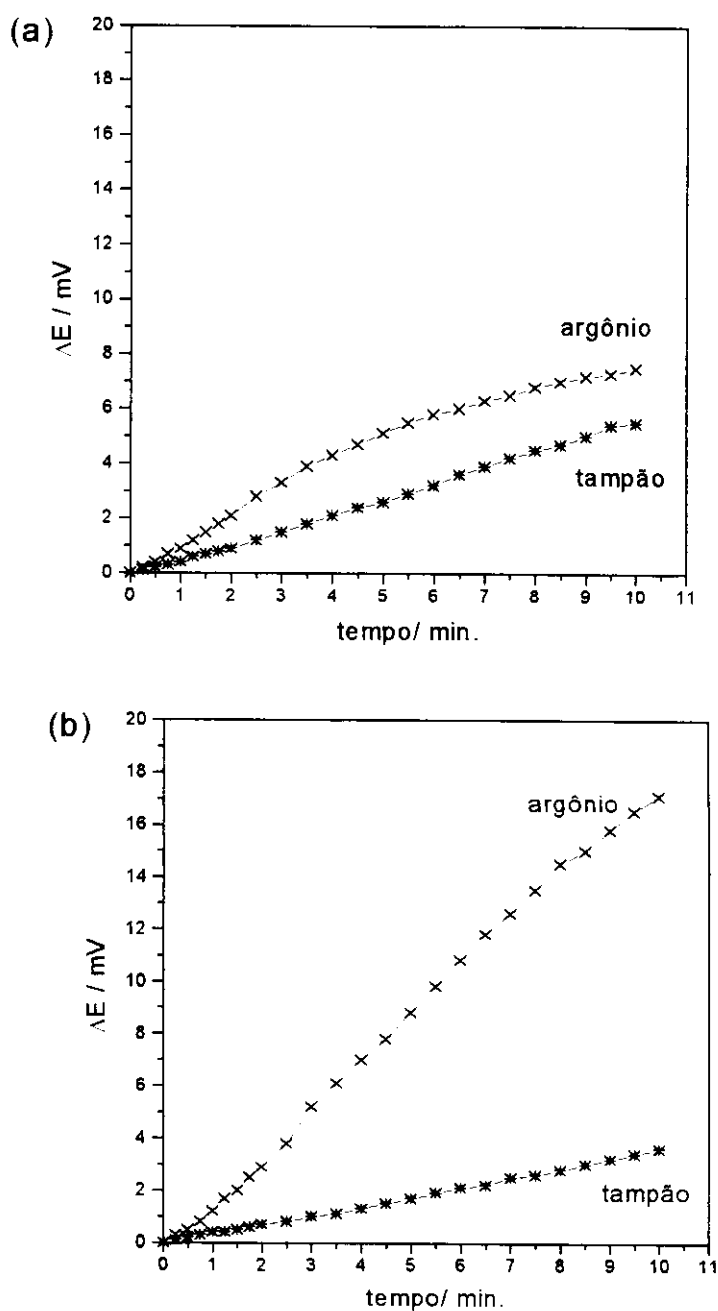


Figura XII.14(a) e (b) - Curvas cinéticas obtidas com fatias do talo de beterraba irradiadas em ambiente de argônio e tampão citrato 0,05 mol/L a pH=4,0 com 1 mmol/L de EDTA 4 dias após a irradiação. Solução de ácido oxálico 1 mmol/L em tampão citrato 0,05 mol/L a pH=4,0 contendo 1mmol/L de EDTA e 2 mmol/L de 8 hidroxiquinolina. Temperatura de 30°C.(a) oxalato oxidase imobilizada em tecido vegetal, (b) oxalato oxidase purificada imobilizada por método de suporte com ligação covalente.

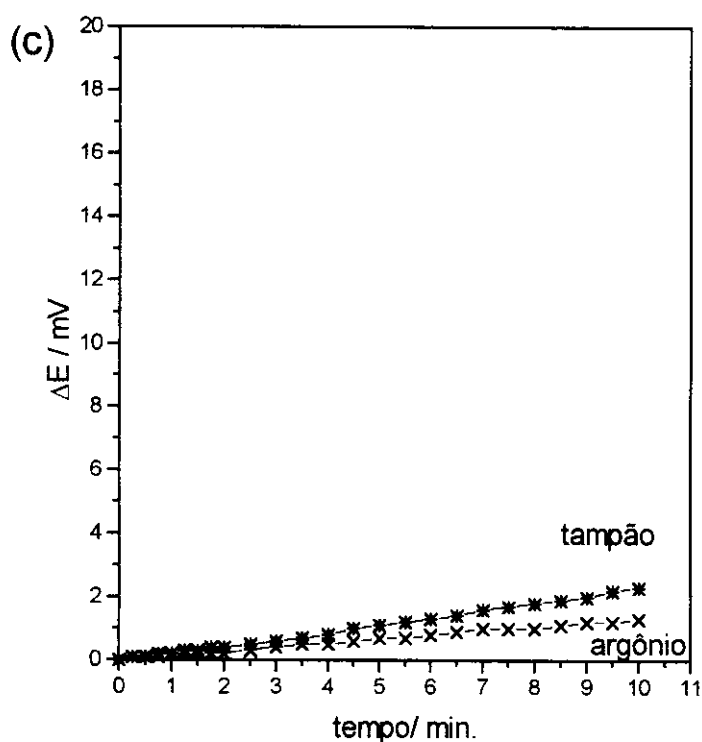


Figura XII.14 - Curvas cinéticas obtidas com fatias do talo de beterraba irradiadas em ambiente de argônio e tampão citrato 0,05 mol/L a pH=4,0 com 1 mmol/L de EDTA 4 dias após a irradiação. Solução de ácido oxálico 1 mmol/L em tampão citrato 0,05 mol/L a pH=4,0 contendo 1 mmol/L de EDTA e 2 mmol/L de 8 hidroxiquinolona.

Temperatura de 30°C.(c) oxalato oxidase purificada imobilizada por método de ligação química com o suporte utilizando reagente polifuncional.

A presença de água produz espécies altamente energéticas como o $\cdot\text{OH}$, $\text{H}\cdot$ e e^-_{aq} . Cada uma destas espécies são capazes de induzir reações sob condições específicas tendo como resultado a desnaturação da enzima⁽⁵⁶⁾. Talvez, o mesmo efeito não afete muito a enzima quando associada com glutaraldeído, pois este pode formar ligações protegendo de certa forma a enzima da desnaturação, o que explicaria até o aumento de ΔE observado.

Assim, quanto a este estudo pode-se concluir que tanto o ambiente quanto a temperatura e a dose de radiação são fatores interligados e que os resultados obtidos da imobilização dependem da combinação destes três fatores de modo a obter melhor imobilização com o mínimo de perda na atividade enzimática com o maior tempo de vida útil e maior estabilidade após o período de máxima atividade, do que as imobilizações realizadas sem a irradiação gama.

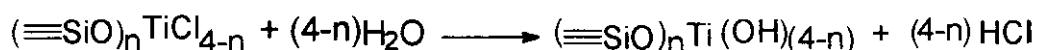
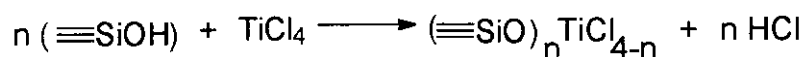
Quanto à escolha do ambiente de irradiação constatou-se ser o oxigênio um inibidor competitivo do processo de imobilização e o argônio como sendo o melhor meio devido a menor quantidade de oxigênio no sistema. O argônio é então, o melhor ambiente de irradiação quando não se tem a associação de glutaraldeído no processo de imobilização enzimática, via radiação gama.

Capítulo XIII

Imobilização enzimática por oclusão na pasta de carbono no biossensor amperométrico utilizando mediadores eletrônicos

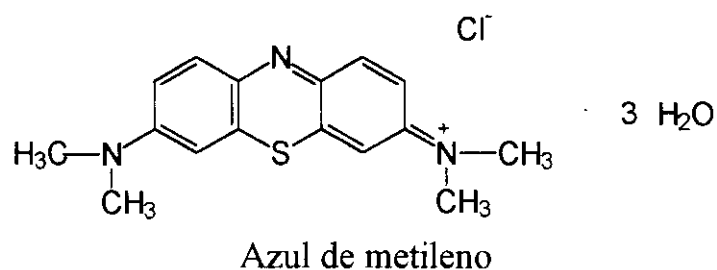
XIII.1 - Influência dos mediadores utilizados

Os mediadores utilizados para construção destes biossensores amperométricos foram: o azul de metileno e o azul de meldola, imobilizados na superfície de sílica gel inorganofuncionalizada. Substâncias inorgânicas como a sílica, têm sido utilizadas nos eletrodos de pasta de carbono para acumular analitos, baseando-se nas propriedades de adsorção e/ou troca-iônica dos modificadores⁽⁵⁷⁾. A inorganofuncionalização da sílica gel com óxido de titânio pode ser representada de acordo com o esquema abaixo⁽³⁷⁾.



Sobre esta sílica, imobilizou-se o azul de metileno; este mediador é lixiviado para a solução, quando o eletrodo é armazenado em tampão

succinato, durante uma semana, indicando que o mediador deve estar adsorvido no suporte. Isto ocorre pois tanto a sílica como o azul de metileno encontram-se positivamente carregados. Através de espectros na região do visível obtidos com o azul de metileno em solução e imobilizado em sílica (Figura XIII.1), não se observou deslocamento significativo do pico obtido para este mediador (na solução de 661 nm e na sílica de 665 nm). Este fato demonstra que não existem ligações muito fortes entre o azul de metileno e a sílica modificada.



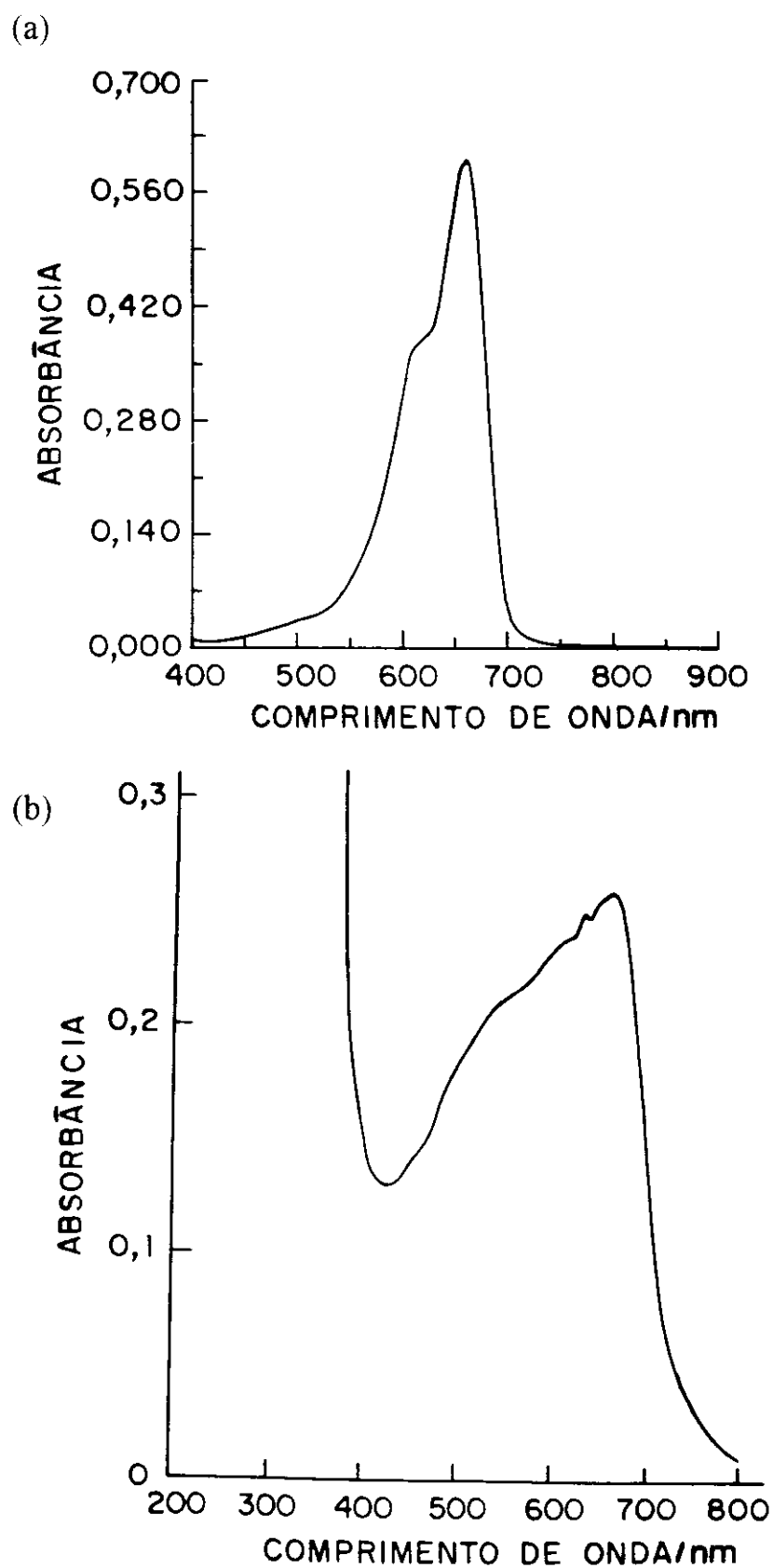
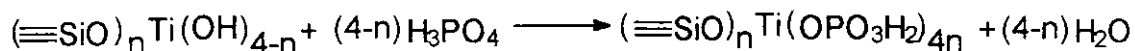
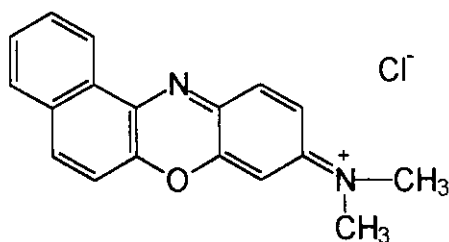


Figura XIII.1 - Espectros de absorção na região do visível, obtido para mediador azul de metileno (a) dissolvida em água e (b) imobilizado em sílica gel inorganofuncionalizada com óxido de titânio.

Já o azul de meldola, foi imobilizado sobre a superfície da sílica gel modificada por óxido de titânio - fosfato segundo a reação química representada a seguir⁽³⁸⁾:



O fosfato quimicamente ligado ao titânio, deixa a superfície da sílica carregada negativamente permitindo a ligação com o mediador, azul de meldola, carregado positivamente. Pode-se observar um deslocamento no pico de absorção máxima do azul de meldola na sílica (575 nm) em relação à solução (566,5 nm) e como mostra a Figura XIII.2. Este deslocamento poderia ter sido causado por formação de ligações entre o azul de meldola e a sílica modificada.



Azul de meldola

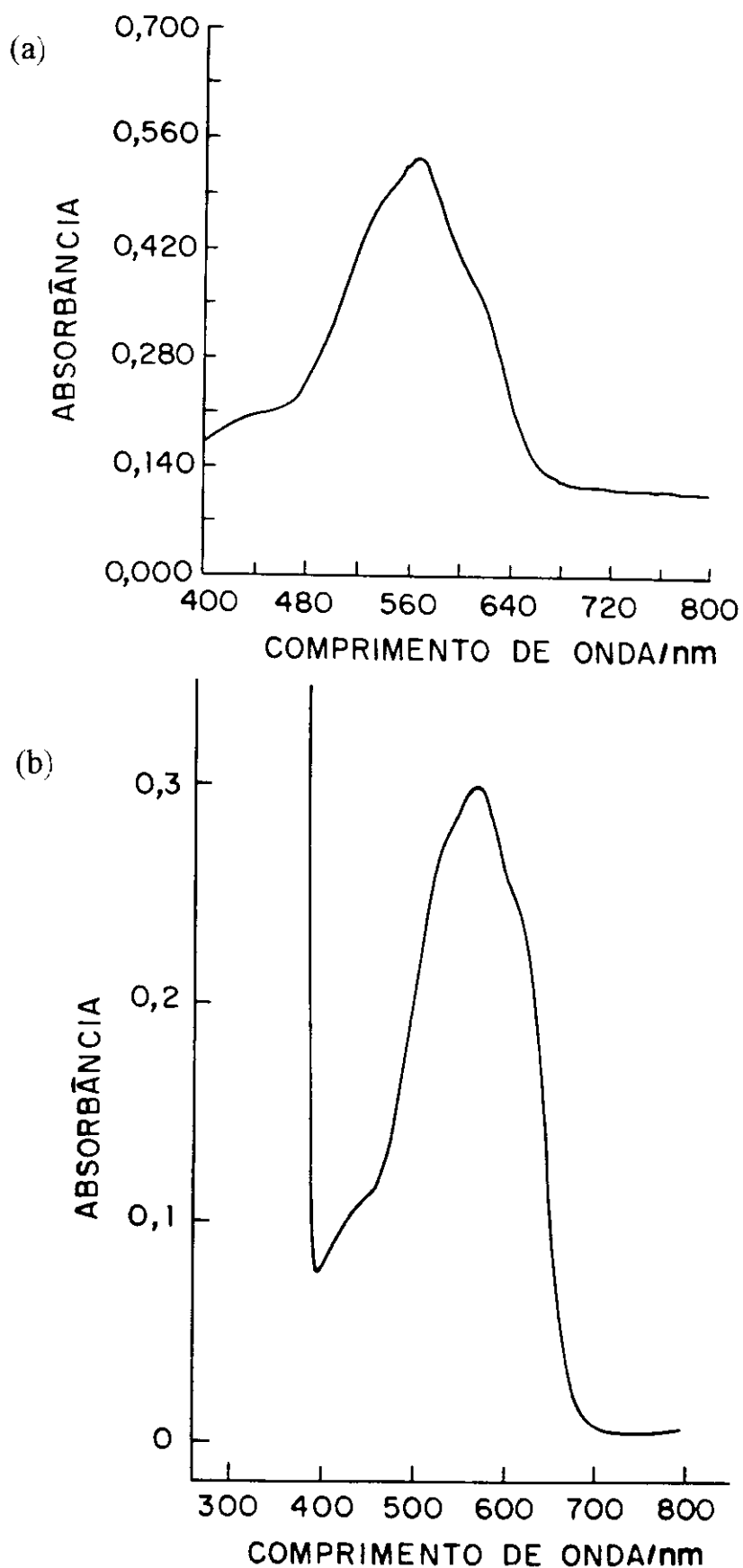


Figura XIII.2 - Espectro de absorção na região do visível, obtido para o mediador azul de meldola (a) dissolvido em água e (b) imobilizado em sílica gel inorganofuncionalizada com óxido de titânio-fosfato.

Para verificar o efeito dos mediadores na pasta de carbono, são feitos voltamogramas cíclicos utilizando-se pastas com e sem os mediadores. Como pode-se observar pelas Figuras XIII.3 e XIII.4, os voltamogramas cíclicos obtidos com as pastas de carbono utilizando sílica funcionalizada, contendo ou não os mediadores imobilizados, apresentaram diferenças significativas.

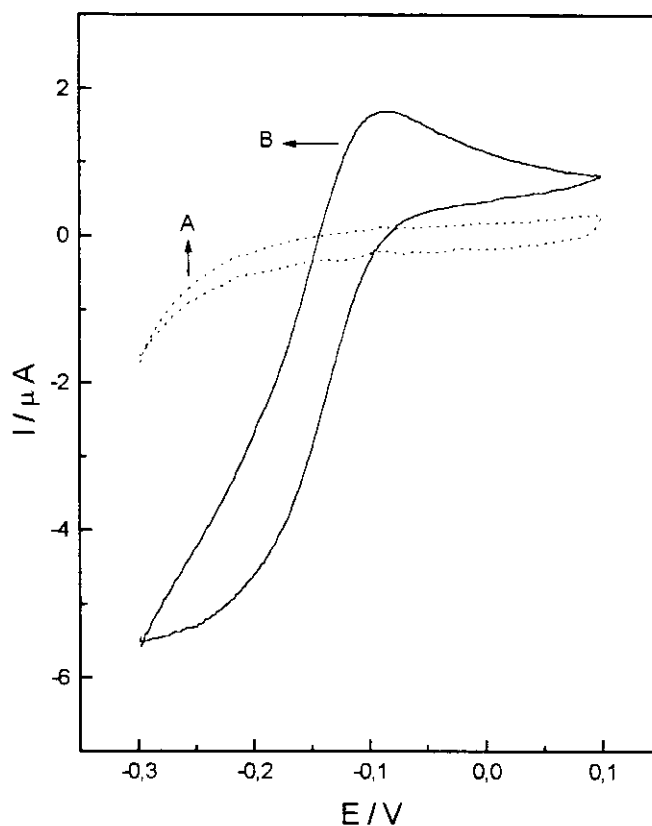


Figura XIII.3 - Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de pasta de carbono (A) sem o azul de metileno e (B) com azul de metileno. Velocidade de varredura de 20 mV/s, temperatura de 25°C, eletrólito suporte KCl 0,1 mol/L. Eletrodo de Calomelano saturado como eletrodo de referência.

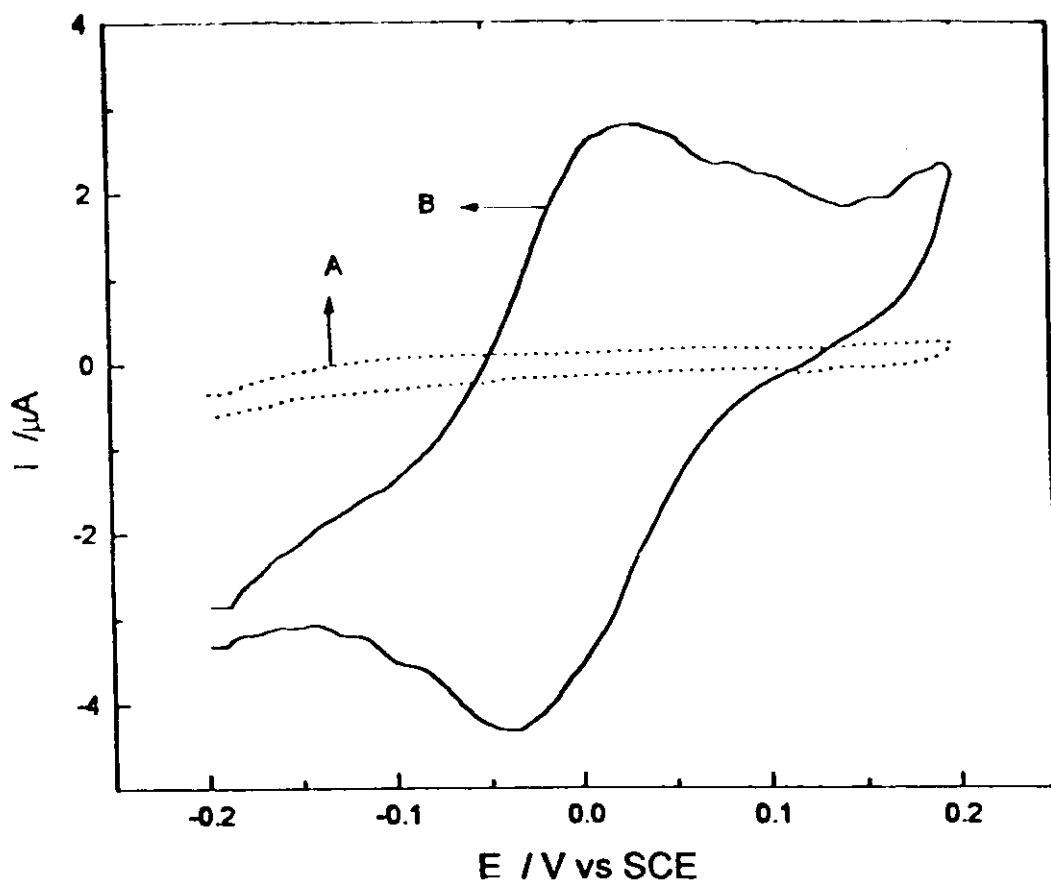


Figura XIII.4 - Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de pasta de carbono (A) sem o azul de meldola e (B) com azul de meldola. Velocidade de varredura de 20 mV/s, temperatura de 25⁰C, eletrólito suporte KCl 0,1 mol/L. Eletrodo de Calomelano saturado como referência.

Os voltamogramas obtidos, utilizando a pasta de carbono sem incorporação do mediador na sílica, não apresentaram picos anódicos e catódicos, diferentemente de quando se utilizou o mediador. Além disso, a ação enzimática para transformar o ácido oxálico em H_2O_2 , exige um alto potencial entre +600 a +700 mV vs ECS. Este alto potencial constituiu-se num inconveniente pois, os sinais das espécies interferentes aumentam com o aumento do potencial aplicado⁽³⁸⁾.

Com a utilização dos mediadores, conseguiu-se abaixar este potencial a ser aplicado, para -50 mV e +60 mV para o azul de metileno e azul de meldola, respectivamente.

XIII.2 - Influência da velocidade de varredura

Para verificar e determinar a influência da velocidade de varredura realizaram-se os voltamogramas cíclicos com velocidades de 2 mV/s, 5 mV/s, 10 mV/s, 20 mV/s e 50 mV/s, mostrados nas Figuras XIII.5 e XIII.6.

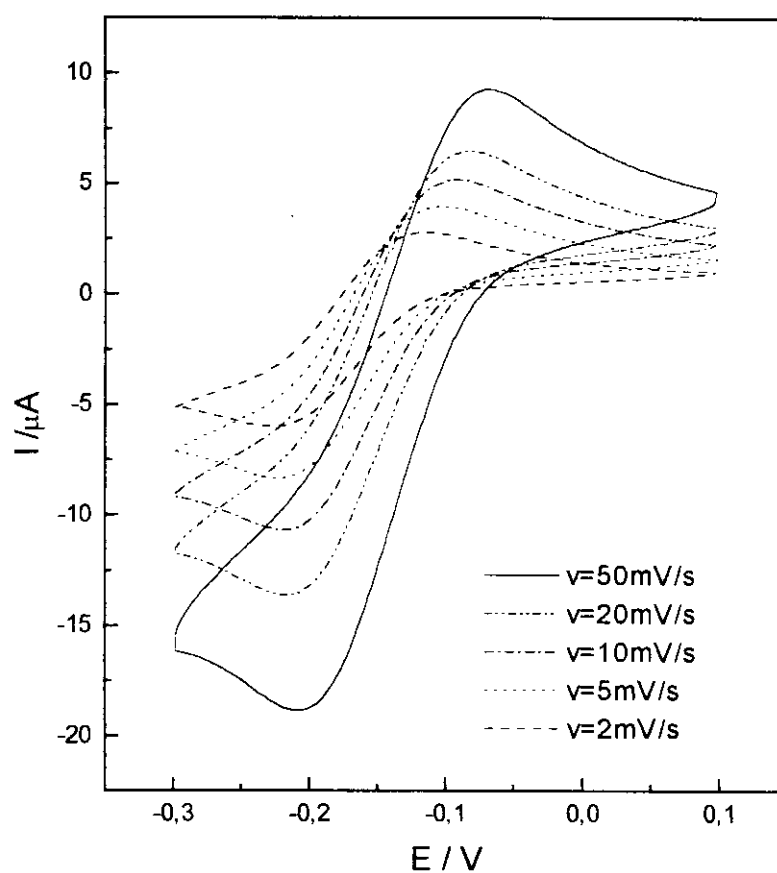


Figura XIII.5 - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl 0,1 mol/L, faixa de potencial de -0,3 a +0,3 V, velocidades de varredura de 2 mV/s, 5 mV/s, 10 mV/s, 20 mV/s e 50 mV/s. Eletrodo de pasta de carbono com a sílica gel inorganofuncionalizada com óxido de titânio, com azul de metileno imobilizado. Eletrodo de Calomelano saturado como eletrodo de referência.

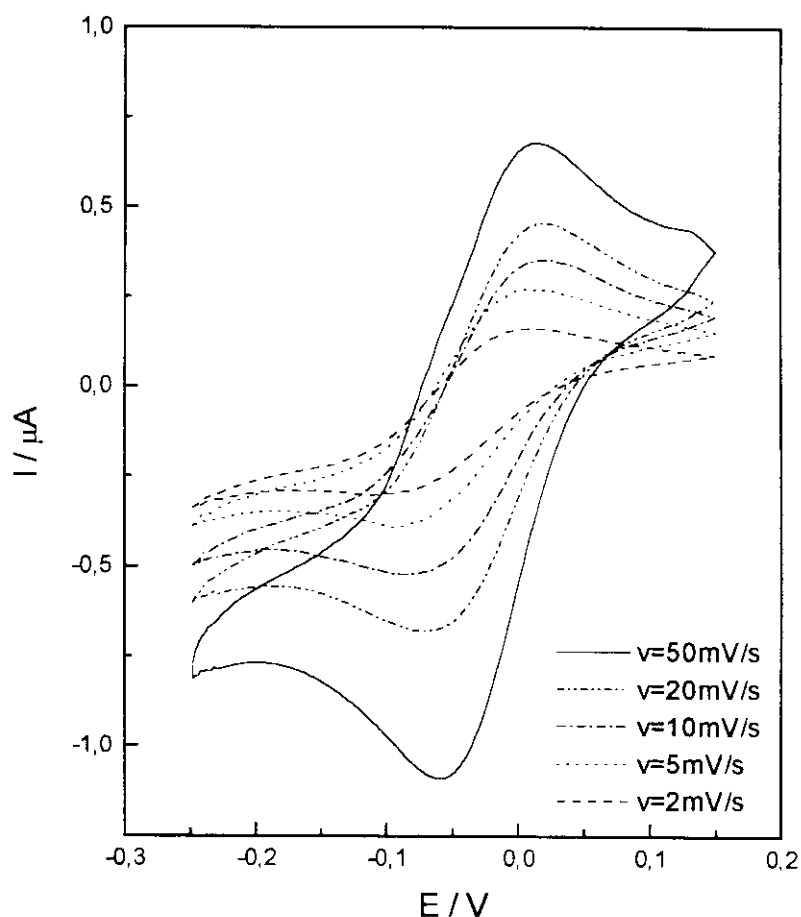


Figura XIII.6 - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl 0,1 mol/L, na faixa de potencial de -0,3 a +0,3 V, velocidades de varredura de 2 mV/s, 5mV/s, 10mV/s, 20mV/s e 50 mV/s. Eletrodo de pasta de carbono com sílica gel inorganofuncionalizada com óxido de titânio-fosfato, com azul de meldola imobilizado. Eletrodo de Calomelano saturado como eletrodo de referência.

Verificou-se que, quanto maior a velocidade de varredura, maior o ΔI entre os picos anódicos e catódicos, para ambos eletrodos. Assim, para estudar-se os efeitos adsorptivos ou difusionais sobre o eletrodo, construíram-se gráficos de I_p (corrente do pico de oxidação) vs v (velocidade de varredura) e de $I_p/v^{1/2}$ (corrente do pico de oxidação dividido por raiz quadrada da velocidade de varredura) vs v (velocidade de varredura) que são mostradas nas Figuras XIII.7(a e b) e XIII.8 (a e b) para avaliar quais destes processos estariam ocorrendo na superfície do eletrodo.

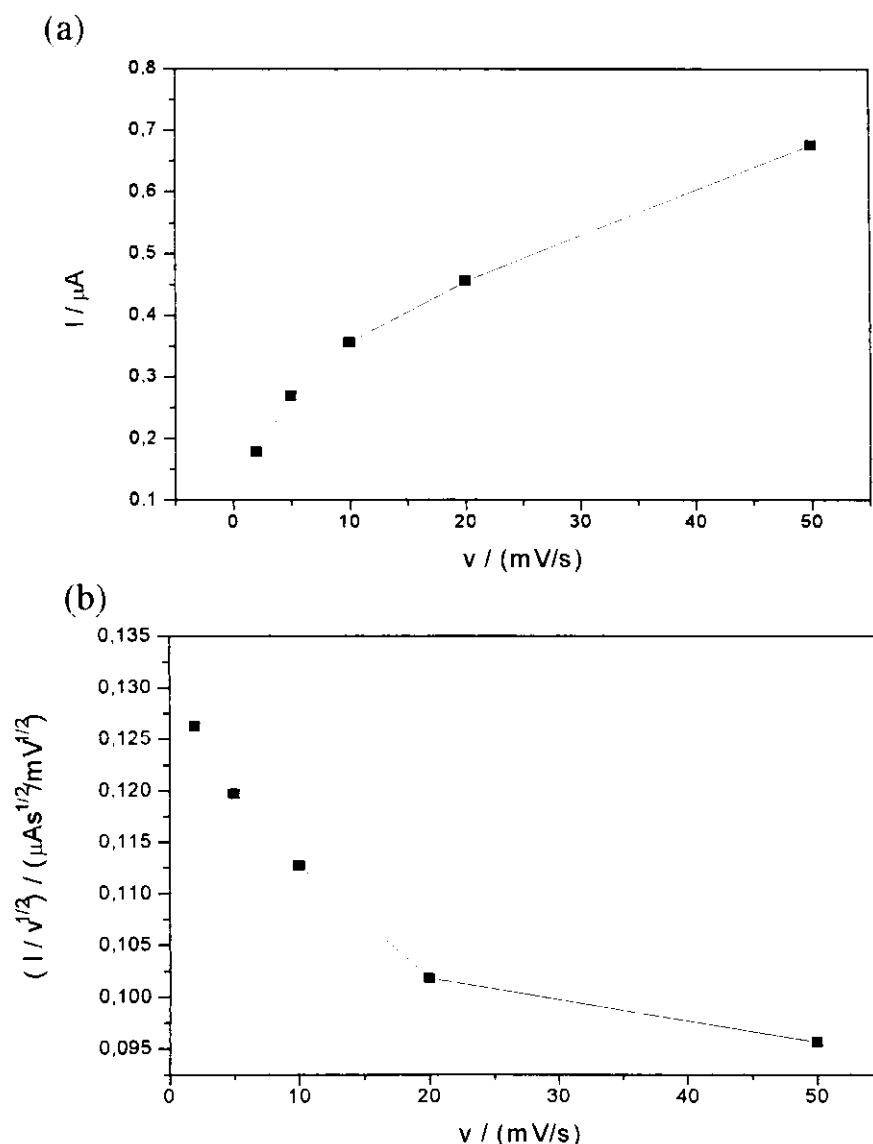


Figura XIII.7 - Efeito da velocidade de varredura (a) na corrente do pico de oxidação e (b) na corrente do pico de oxidação/ raiz quadrada da velocidade de varredura. Mediador utilizado, Azul de metileno. Eletrólito suporte KCl 0,1 mol/L, nas velocidades de varredura de 2, 5, 10, 20 e 50 mV/s.

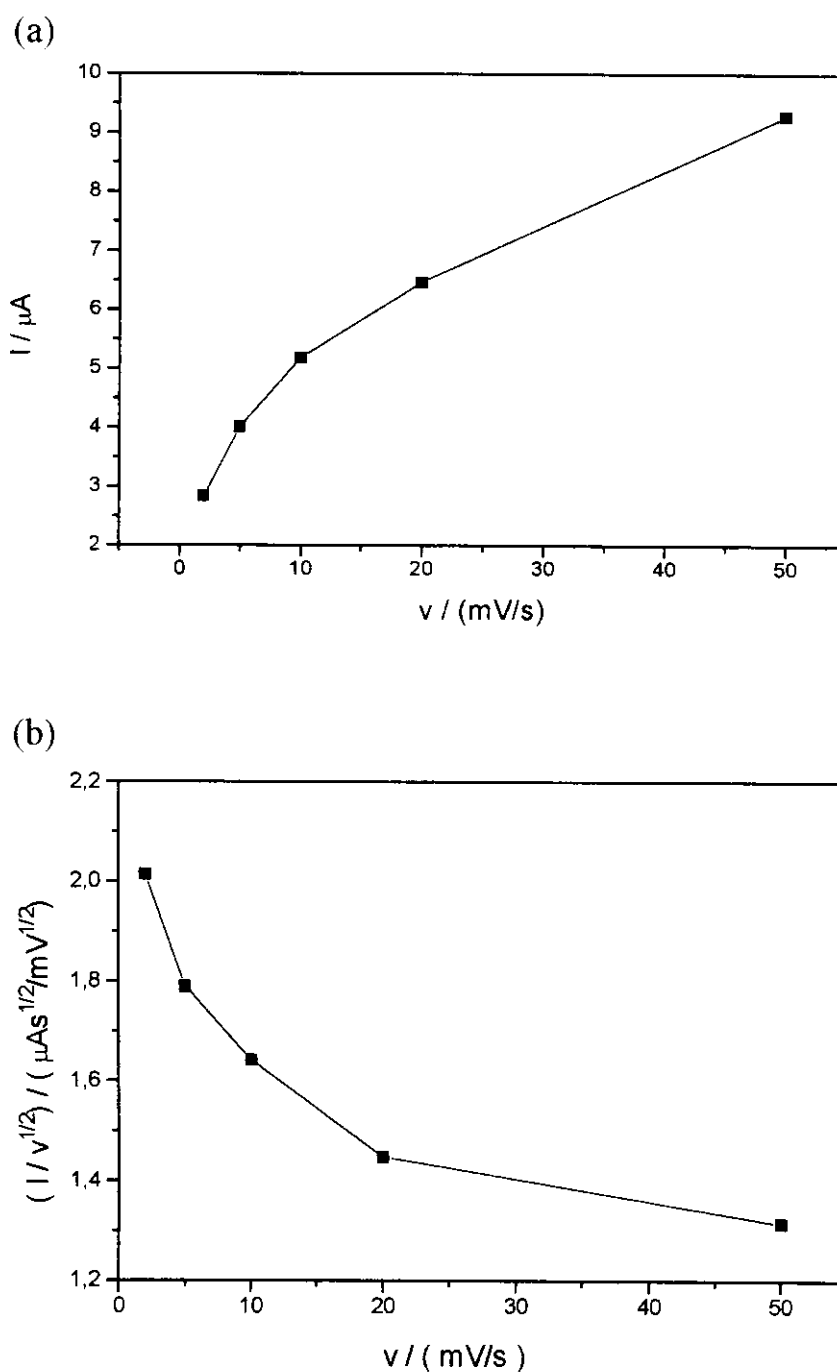


Figura XIII.8 - Efeito da velocidade de varredura (a) na corrente do pico de oxidação e (b) na corrente do pico de oxidação/ raiz quadrada da velocidade de varredura. Mediador utilizado, azul de meldola. Eletrólito suporte KCl 0,1 mol/L , velocidades de varredura de 2, 5, 10, 20 e 50 mV/s.

Conforme mostram as Figuras XIII.7(b) e XIII.8(b), na faixa de velocidade de varredura de 2 a 50 mV/s, há um decréscimo dos valores de $I_p.v^{1/2}$ com o aumento da velocidade de varredura, indicando que o processo que ocorre nos eletrodos não é de controle difusional e as Figuras XIII.7(a) e XIII.8(a) mostram a dependência da corrente com a velocidade de varredura pois esta não aumenta linearmente com a velocidade de varredura. Isto significaria que o processo que ocorre no eletrodo também não é de adsorção. Então, a explicação mais provável seria de que, as reações dos eletrodos sejam controladas por uma etapa cinética ou catalítica⁽⁵⁸⁾.

Considerando que as menores velocidades de varreduras sejam mais adequadas para uma cinética lenta, adotou-se a velocidade de 10 mV/s para realizar os demais estudos.

XIII.3 - Influência da concentração das soluções de eletrólito suporte sobre os mediadores

Para estudar os efeitos das concentrações do eletrólito suporte sobre os mediadores azul de metileno e azul de meldola, obtiveram-se voltamogramas cíclicos na faixa de potencial de - 0,3 a +0,3 V para cada uma das pastas de carbono variando-se as concentrações das soluções de KCl em 0,05 mol/L, 0,1 mol/L e 0,5 mol/L mostrados nas Figuras XIII.9 e XIII.10.

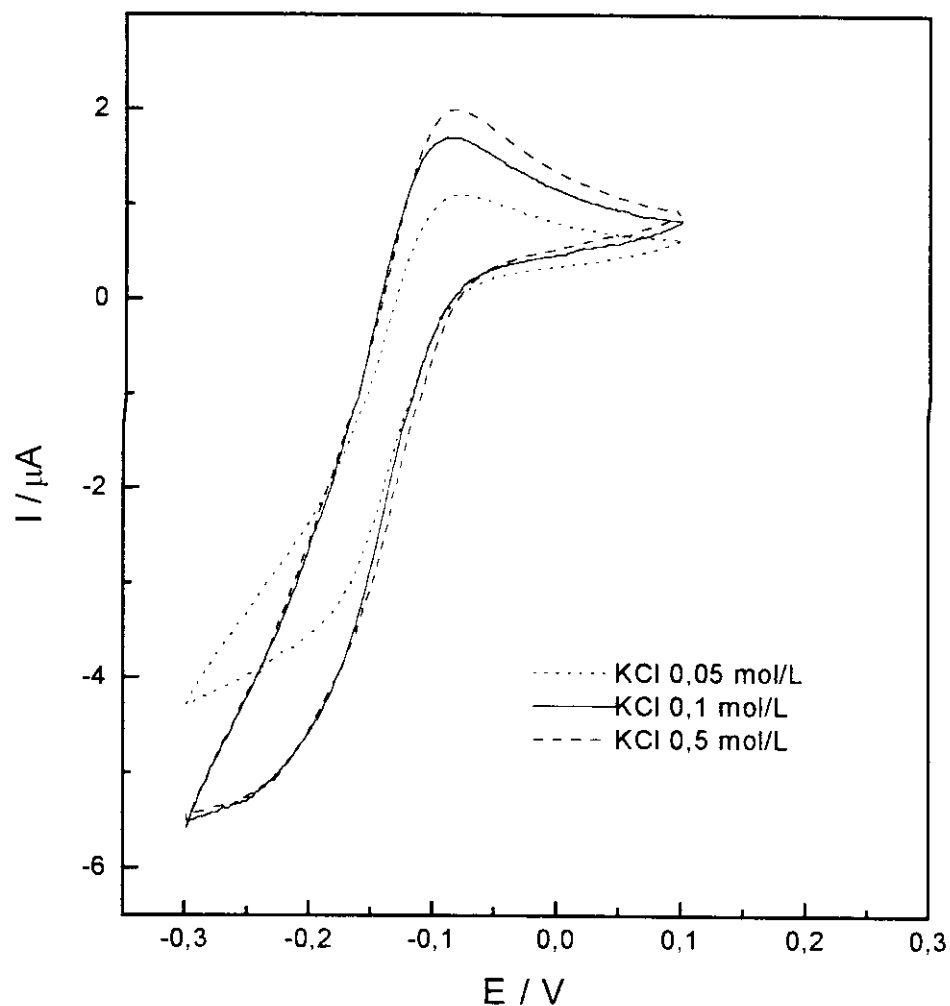


Figura XIII.9 - Voltamogramas cíclicos obtidos com soluções de KCl de 0,05 mol/L, 0,1 mol/L e 0,5 mol/L. Eletrodo de pasta de carbono utilizando como mediador o azul de metileno. Velocidade de varredura de 10 mV/s a 25⁰C na faixa de potencial de - 0,3 a +0,3 V vs ECS.

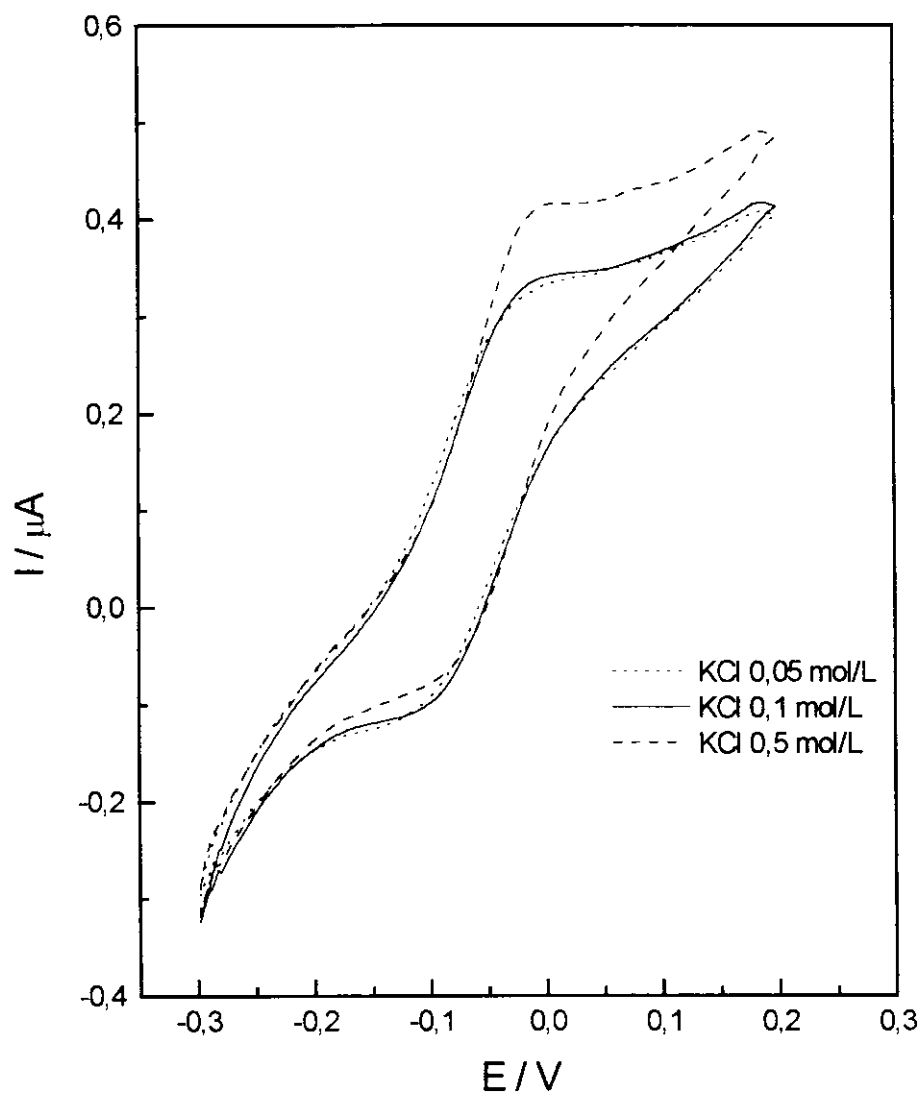


Figura XIII.10 - Voltamogramas cíclicos obtidos com soluções de KCl de 0,05 mol/L, 0,1 mol/L e 0,5 mol/L, Eletrodo de pasta de carbono utilizando como mediador o azul de meldola. Velocidade de 10 mV/s a 25°C na faixa de potencial de - 0,3 a +0,3 V vs ECS.

Considerando as figuras observa-se que, quanto maior a concentração do eletrólito suporte, maior é a corrente obtida no pico de oxidação, ou seja, a corrente obtida é diretamente proporcional a concentração do eletrólito devido a maior condutividade iônica da solução além de maior controle da força iônica da solução e a grande mobilidade destes íons.

XIII.4 - Influência de alguns cátions e de alguns ânions

Pelas Figuras XIII.11(a e b), pode-se observar que em relação ao mediador azul de metileno, não houveram variações significativas quanto aos potenciais dos picos de oxidação obtidos pelos voltamogramas das soluções contendo cátions K^+ , Li^+ , Na^+ e NH_4^+ . Entretanto, todos os ânions estudados (Cl^- , SO_4^{2-} , ClO_4^- , NO_3^- e Ac^-) apresentaram deslocamentos nos potenciais médios, sendo que o mais pronunciado foi para o ânion acetato.

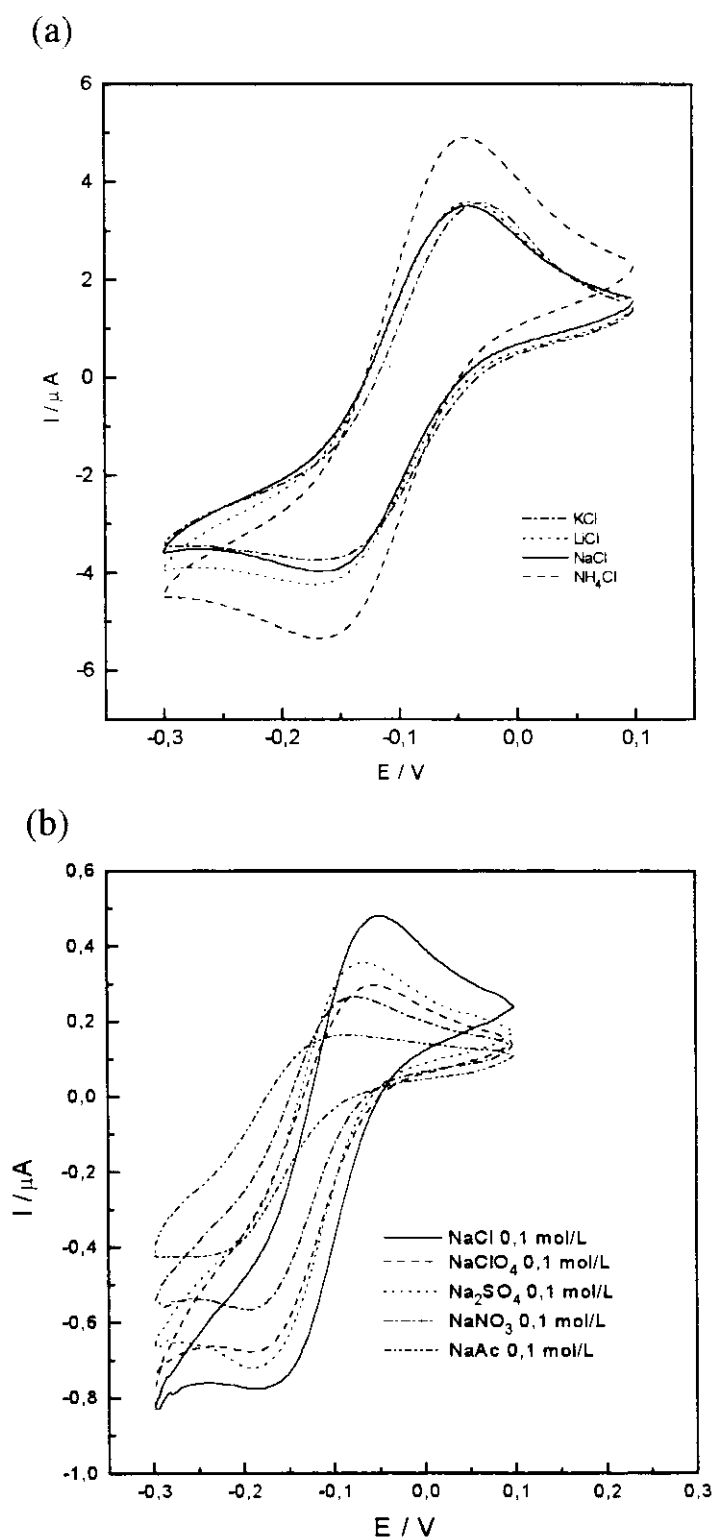


Figura XIII.11 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de pasta de carbono utilizando azul de metileno; velocidade de varredura de 10 mV/s , temperatura de 25°C com borbulhamento de N_2 por 10 min . (a) Soluções de KCl , LiCl , NaCl , NH_4Cl . (b) NaCl , NaClO_4 , Na_2SO_4 , NaNO_3 e NaAc nas concentrações de $0,1 \text{ mol/L}$. Eletrodo de Calomelano saturado como eletrodo de referência.

Já para o azul de meldola (Figura XIII.12), observa-se que há um deslocamento do potencial médio quando utilizada a solução contendo cátion NH_4^+ . Enquanto que para os ânions estudados, não houve deslocamento dos potenciais médios tão significativos quanto os obtidos para o azul de metileno.

Isto pode significar que, devido à carga existente na superfície da sílica e do tipo de imobilização sofrida pelo mediador, a presença de cátions e/ou de ânions interfira de forma diferente nos mediadores. No caso do azul de metileno (mediador catiônico), estando imobilizado por adsorção na sílica, com superfície carregada positivamente, na presença de cátion, sofreria pouca influência, enquanto que os ânions, por possuir uma carga oposta ao do mediador podem vir a competir trocando algum ânion na sua estrutura iônica. Para o azul de meldola, estando a superfície da sílica carregada negativamente através da inorganofuncionalização por óxido de titânio-fosfato forma uma ligação do mediador catiônico com a sílica. Então, a presença de ânions, não exerce tanto influência nos voltamogramas obtidos. Quanto aos cátions, somente o amônio apresentou um deslocamento significativo nos potenciais médios, isto poderia ser devido a alguma interação deste íon com o mediador.

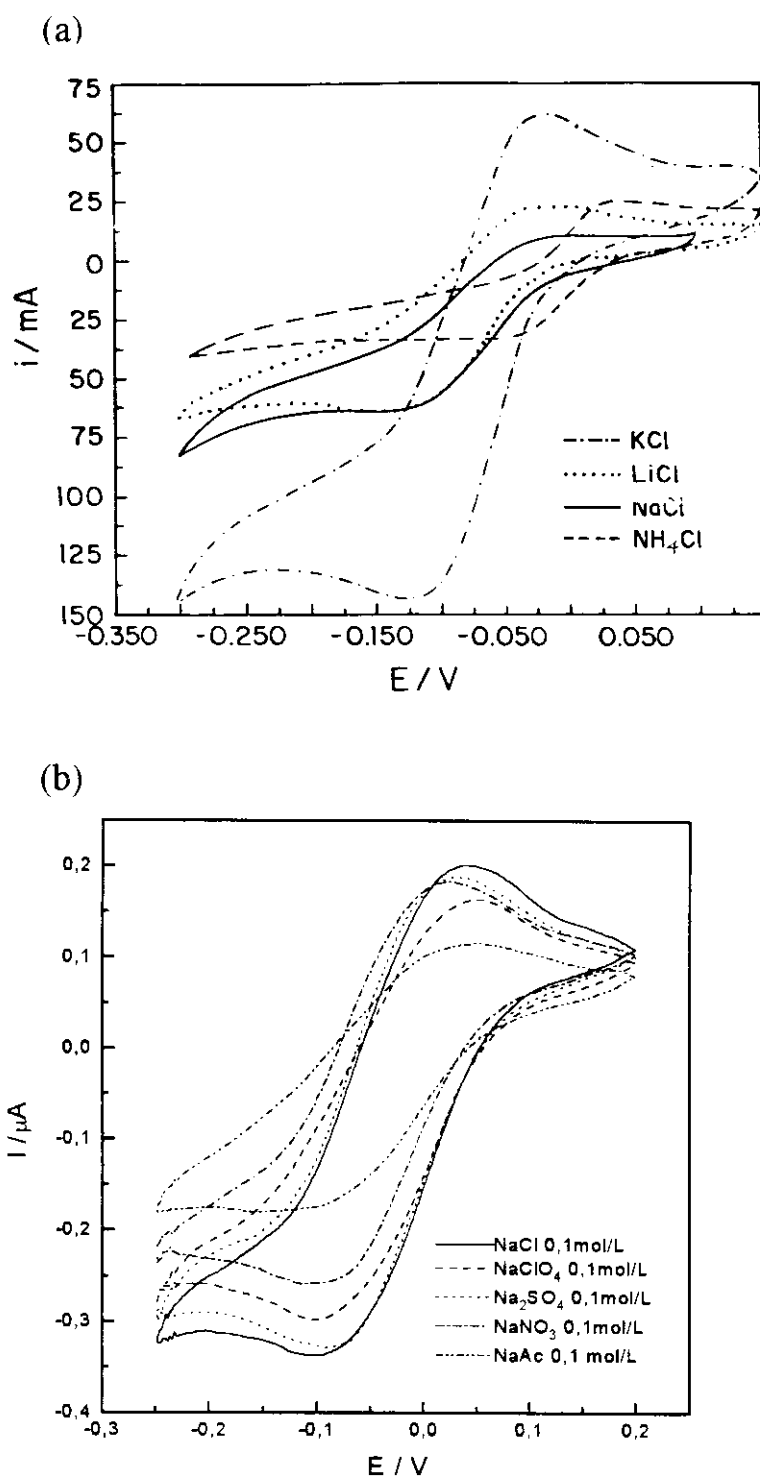


Figura XIII.12 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de pasta de carbono utilizando azul de meldola. Velocidade de varredura de 10 mV/s, temperatura de 25⁰C, com borbulhamento de N₂ por 10 min. (a) Soluções de KCl, LiCl, NaCl, NH₄Cl (b) NaCl, NaClO₄, Na₂SO₄, NaNO₃ e NaAc nas concentrações de 0,1 mol/L. Eletrodo de referência ECS.

XIII.5 - Influência dos tampões usados como eletrólito suporte sobre os mediadores

Considerando-se que a enzima a ser utilizada para construção do biossensor era a oxalato oxidase extraída da cevada, cujo pH ótimo é de 3,8, utilizaram-se soluções de KCl 0,1 mol/L, tampão succinato 0,1 mol/L e tampão citrato 0,1 mol/L com pH's ajustados em 4,0.

Conforme mostram as Figuras XIII.13 e XIII.14, os potenciais médios obtidos com os tampões succinato e citrato permanecem praticamente inalterados para o azul de metileno e para o azul de meldola, embora haja um deslocamento destes potenciais médios em relação aos voltamogramas obtidos com solução de KCl. Isto possibilita a utilização de qualquer uma destas soluções como eletrólito suporte. Devido à maior variação de corrente entre os picos anódicos e catódicos para o azul de meldola, com o tampão citrato, este seria o melhor eletrólito suporte para este mediador. O azul de metileno, por ter alta solubilidade em água, estando apenas adsorvido na sílica e no grafite, é lentamente lixiviado da pasta, quando estocado em solução por período superior a 1 mês.

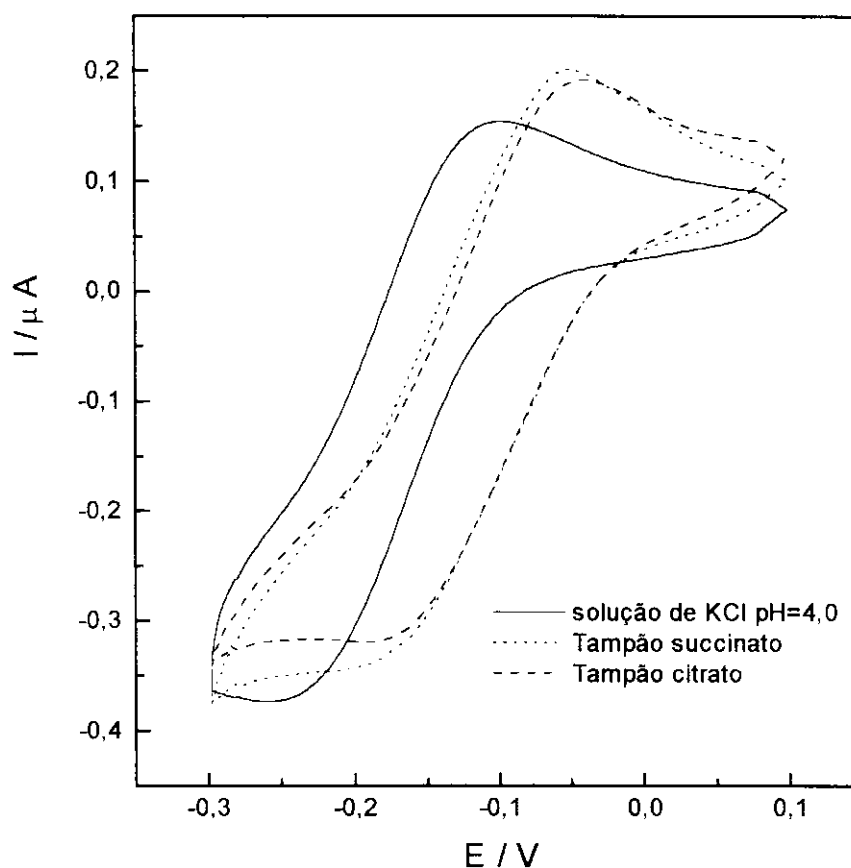


Figura XIII.13 - Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo pasta de carbono contendo azul de metileno com soluções de KCl 0,1 mol/L, tampão succinato 0,1 mol/L e tampão citrato 0,1 mol/L com pH's ajustados para 4,0. Velocidade de varredura de 10 mV/s, temperatura de 25⁰C, com 10 min. de borbulhamento de N₂, faixa de potencial de - 0,3 a +0,3V vs ECS.

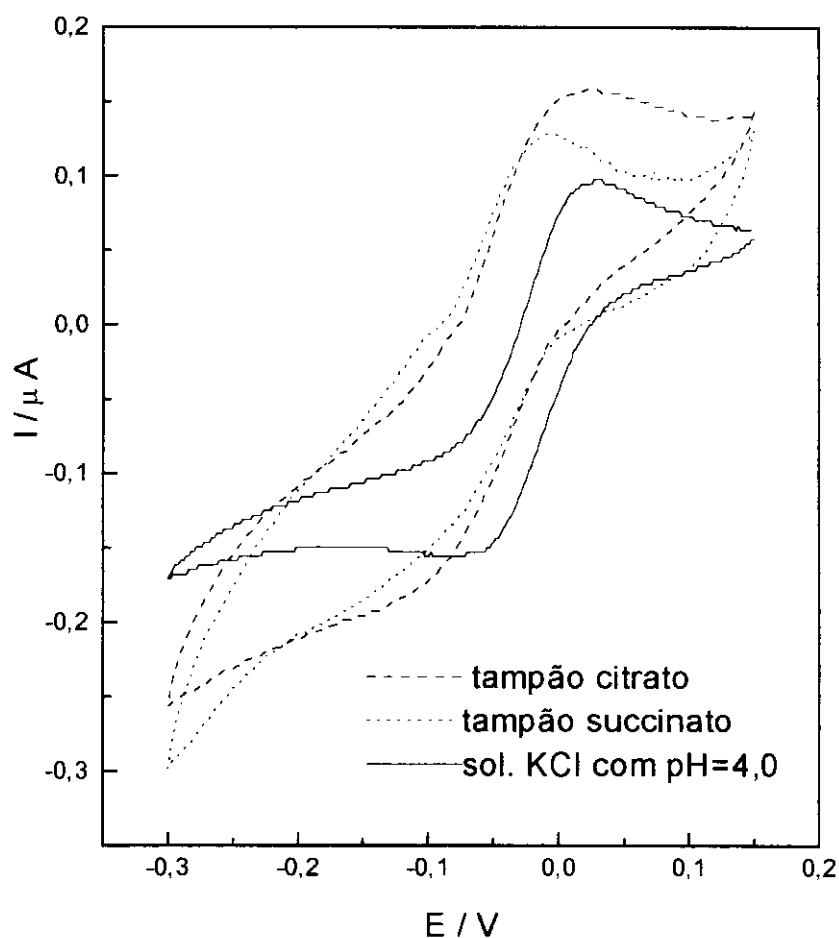
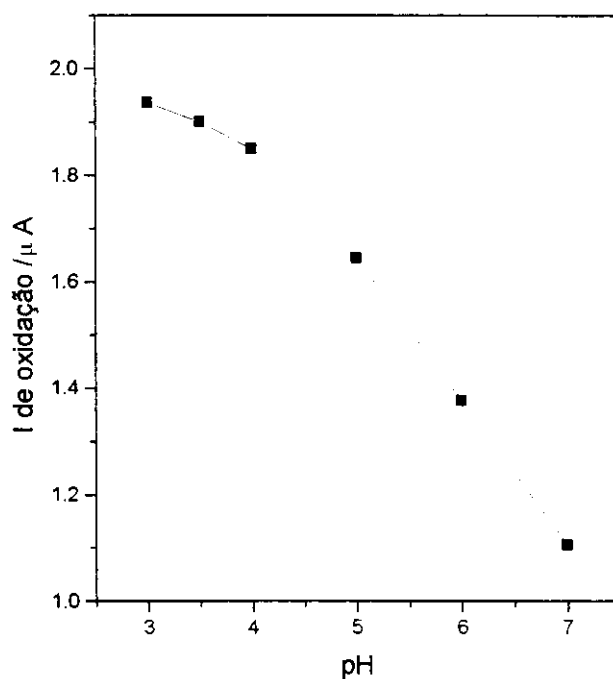


Figura XIII.14 - Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo pasta de carbono contendo azul de meldola com soluções de KCl 0,1 mol/L, tampão succinato 0,1 mol/L e tampão citrato 0,1 mol/L com pH's ajustados para 4,0. Velocidade de varredura de 10 mV/s, temperatura de 25°C, com 10 min. de borbulhamento de N₂, faixa de potencial de - 0,3 a +0,3V vs ECS.

(a)



(b)

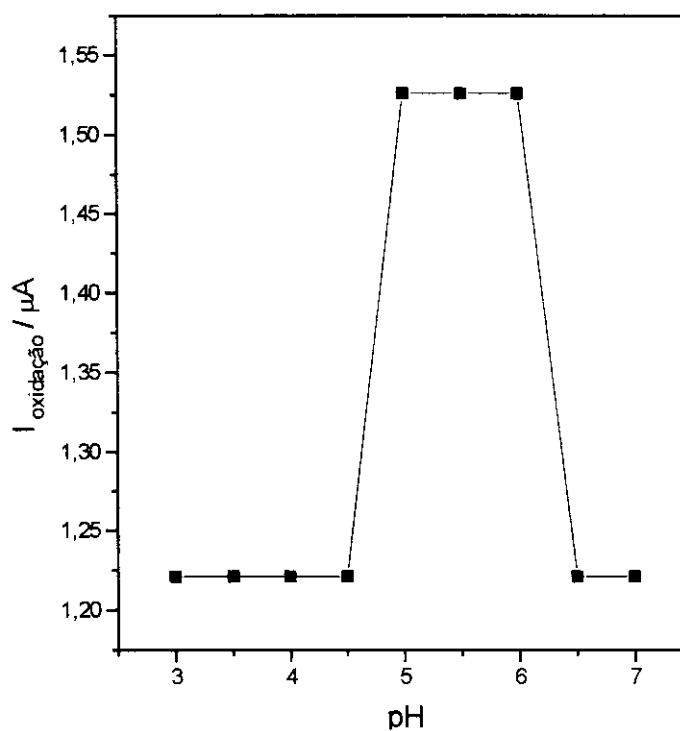
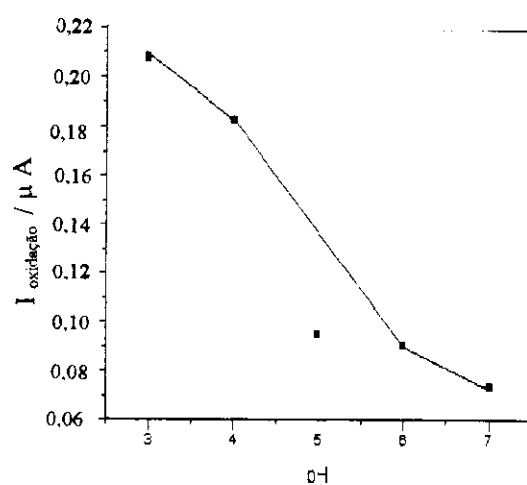


Figura XIII.15 - Curvas obtidas com a variação de corrente do pico de oxidação, em função da variação do pH das soluções ácido succínico em diferentes pH's ajustados com soluções de NaOH ou H₂SO₄. Para (a) o eletrodo modificado com sílica gel e azul de metileno e (b) biossensor com azul de metileno como mediador.

(a)



(b)

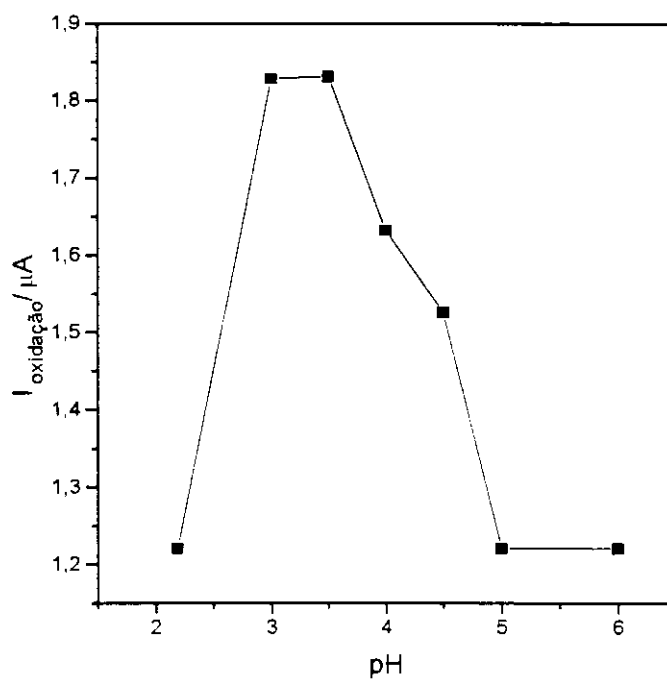


Figura XIII.16 - Curvas obtidas com a variação de corrente do pico de oxidação, em função da variação de pH das soluções ácido succínico em diferentes pH's ajustados com soluções de NaOH ou H₂SO₄. Para (a) o eletrodo modificado com sílica gel e azul de meldola e (b) biossensor com azul de meldola como mediador.

Observa-se pelas Figuras XIII.15 e XIII.16 que, os mediadores sem a incorporação da enzima na pasta, apresentam pH's ótimos diferentes daqueles apresentados com a enzima. O azul de meldola tem pH ótimo na faixa de 3,0 a 3,5 e o azul de metileno, tem o pH ótimo deslocado de 3,0 a 4,0 para faixa de 5,0 a 6,0.

XIII.7 - Curvas de calibração

Para obtenção das curvas de calibração mostradas nas Figuras XIII.17 e XIII.18, fixaram-se os potenciais em -50 mV, para o azul de metileno e +60 mV para o azul de meldola. Visando ter o mínimo de interferências de espécies eletroativas, escolheu-se o valor do potencial do pico de oxidação do azul de metileno obtido pelos voltamogramas cíclicos. Para o azul de meldola, seu pico de oxidação aparece no potencial 0 V, que quando aplicado não apresentou resultados satisfatórios, com variação de corrente muito baixa, escolheu-se portanto o potencial de + 60 mV.

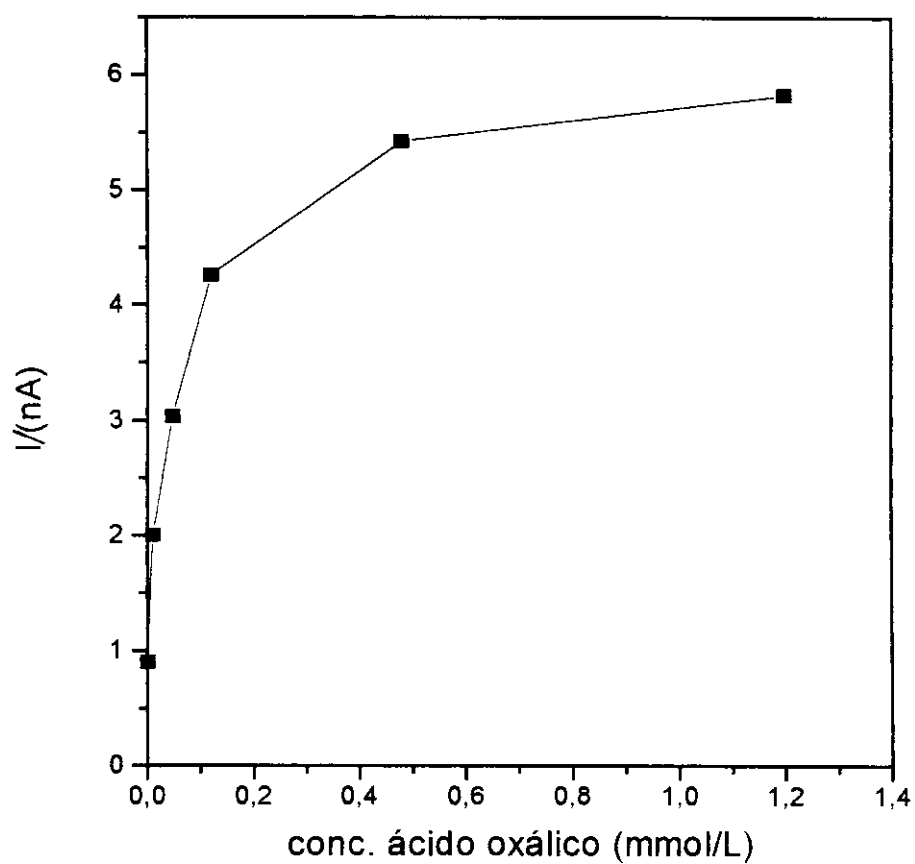


Figura XIII.17 - Curva de calibração obtida para o biossensor com azul de metileno. Solução tampão succinato 0,1 mol/L, pH=4,0 com borbulhamento de N₂ por 10 min. Potencial de - 50 mV vs ECS.

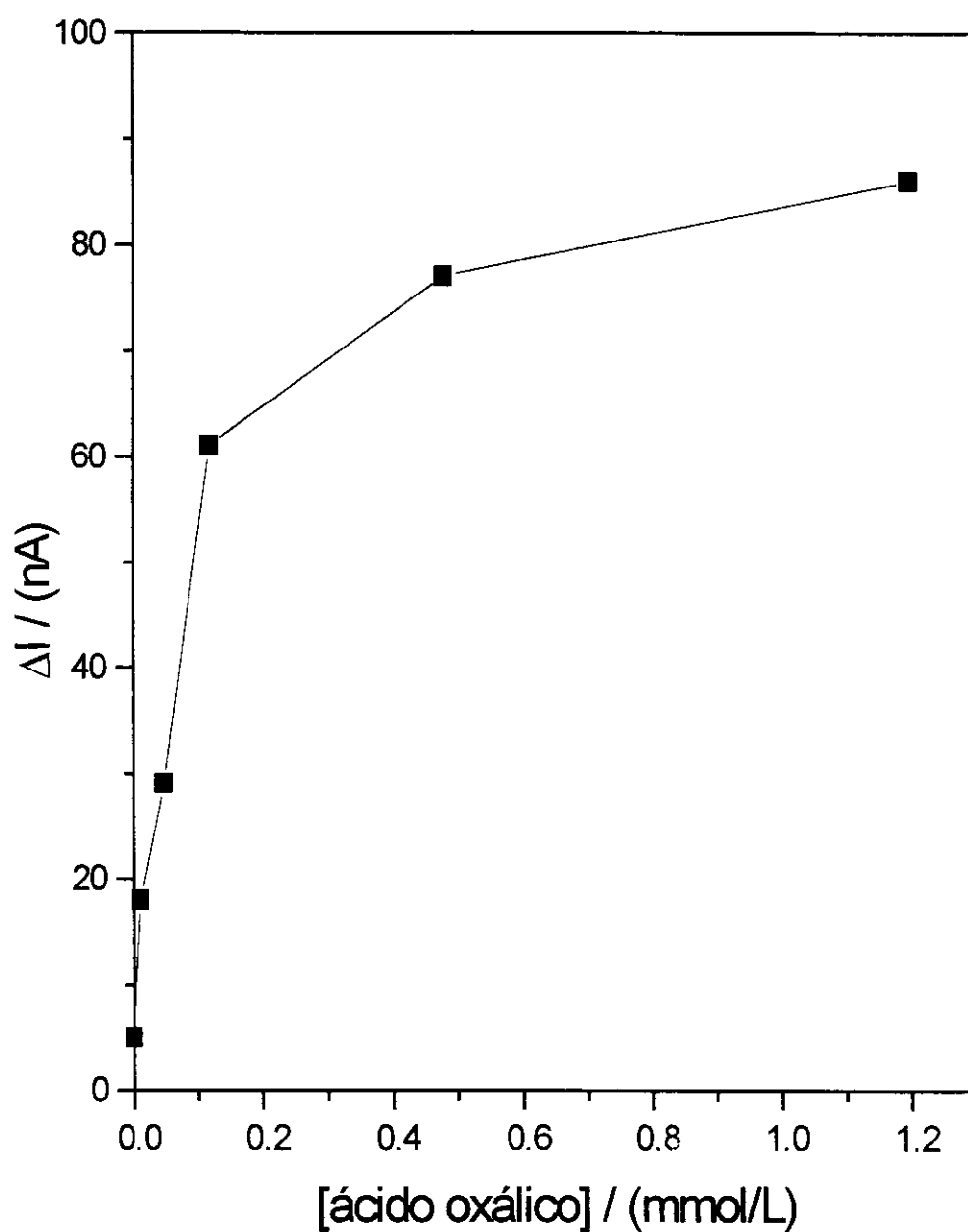


Figura XIII.18 - Curva de calibração obtida para o biossensor com azul de meldola. Solução tampão succinato 0,1 mol/L, pH=4,0 com borbulhamento de N₂ por 10 min. Potencial de +60 mV vs ECS.

As curvas de calibração mostram que, estes biossensores possuem uma faixa útil de 1×10^{-5} a 1×10^{-4} mol/L de ácido oxálico mas, apesar do baixo potencial aplicado para estes biossensores, ainda assim, sofrem grandes interferências, como ácido ascórbico. O ácido ascórbico constitui-se em um dos grandes interferentes para análise de oxalato e está presente na maioria das amostras alimentícias, como por exemplo, nos sucos de laranja e em amostras biológicas como sangue e urina.

Entre os mediadores utilizados, o azul de metileno mostrou-se ter menor interferências causadas por cátions e que as interferências observadas pelos ânions podem ter sido causadas pela interação deste com o azul de metileno. Assim sendo, se o azul de metileno fosse imobilizado sobre o suporte através de uma ligação efetiva, como por exemplo, por uma ligação covalente, eliminaríamos as interferências causadas por ânions e possivelmente pelo ácido ascórbico.

O inconveniente deste biossensor é a necessidade de regeneração da superfície, através de uma raspagem ou de troca de pasta, não permitindo obter um resultado bem reprodutível já que a superfície do eletrodo não é a mesma para todos os ensaios realizados.

XIII.8 - Reatores Amperométricos

Para construção deste reator utilizaram-se de folhas de caruru por serem de baixo custo e de fácil obtenção, podendo ser cultivado no próprio laboratório. Para este reator, as folhas foram escolhidas por possuírem maior atividade enzimática quando comparada com o seu talo, raiz e flores⁽⁴⁸⁾.

Como o reator permite colocar maior quantidade de material que os biossensores convencionais, utilizaram-se as folhas com a enzima imobilizada em tecidos vegetais sem reforço adicional. Para permitir que houvesse maior interação da enzima das folhas de caruru com o substrato, estas folhas foram condicionadas em solução de KCl para possibilitar a

abertura de estômatos liberando assim, os sítios ativos da enzima para a reação.

A vantagem da utilização do reator é permitir a utilização de maior quantidade de enzima, e ser menos afetado por pequenas variações no pH, e na força iônica, temperatura, velocidade de fluxo, e a presença de inibidores e ativadores em pequenas concentrações⁽¹⁷⁾. Para a utilização deste reator num sistema em fluxo, foi necessário colocar no reator uma massa superior a 0,15 g de folhas de caruru cortadas, pois abaixo deste valor, não foi possível obter os picos correspondentes a reação catalítica desejada.

Para construção deste reator, além da massa correta de folhas, estas não poderiam estar molhadas no momento de preencher o reator, porque ocorre a liberação de espumas esverdeadas no interior deste reator que causa interferências nas medidas e nem ressecadas pois torna-se necessário a reidratação destas folhas com solução tampão por um período aproximado de 1 hora. Devido a rápida decomposição das folhas, foi necessário a troca das mesmas do reator após 1 dia de uso contínuo.

Foi escolhido um “loop” de 0,11 mL para injeção das amostras a fim de se obter menor espaço de tempo entre as injeções. Como a detecção do H_2O_2 utilizando um eletrodo de platina e ECS é de +0,7 V, fixou-se este potencial para realizar as medidas de peróxido formado pela reação catalítica.

As alturas dos sinais obtidos em forma de pico, foram utilizadas para construção do gráfico de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk representadas pelas Figuras XIII.19 e XIII.20, respectivamente.

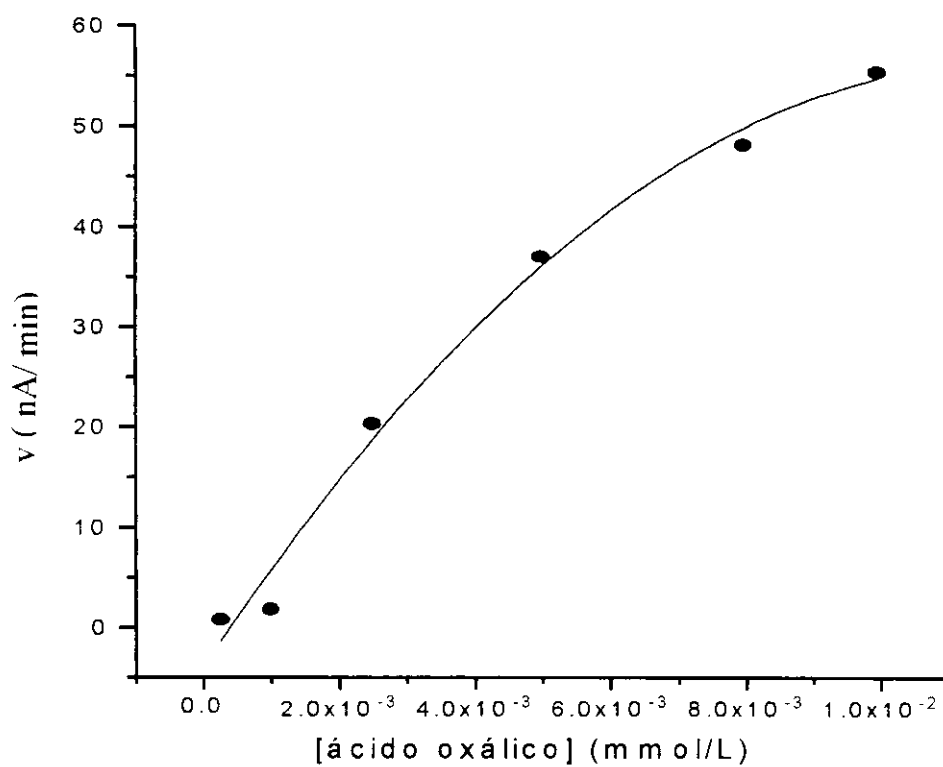


Figura XIII.19 - Gráfico de Michaelis-Menten obtido para folhas de caruru utilizando sistema FIA com potencial aplicado de +0,7 V vs ECS.

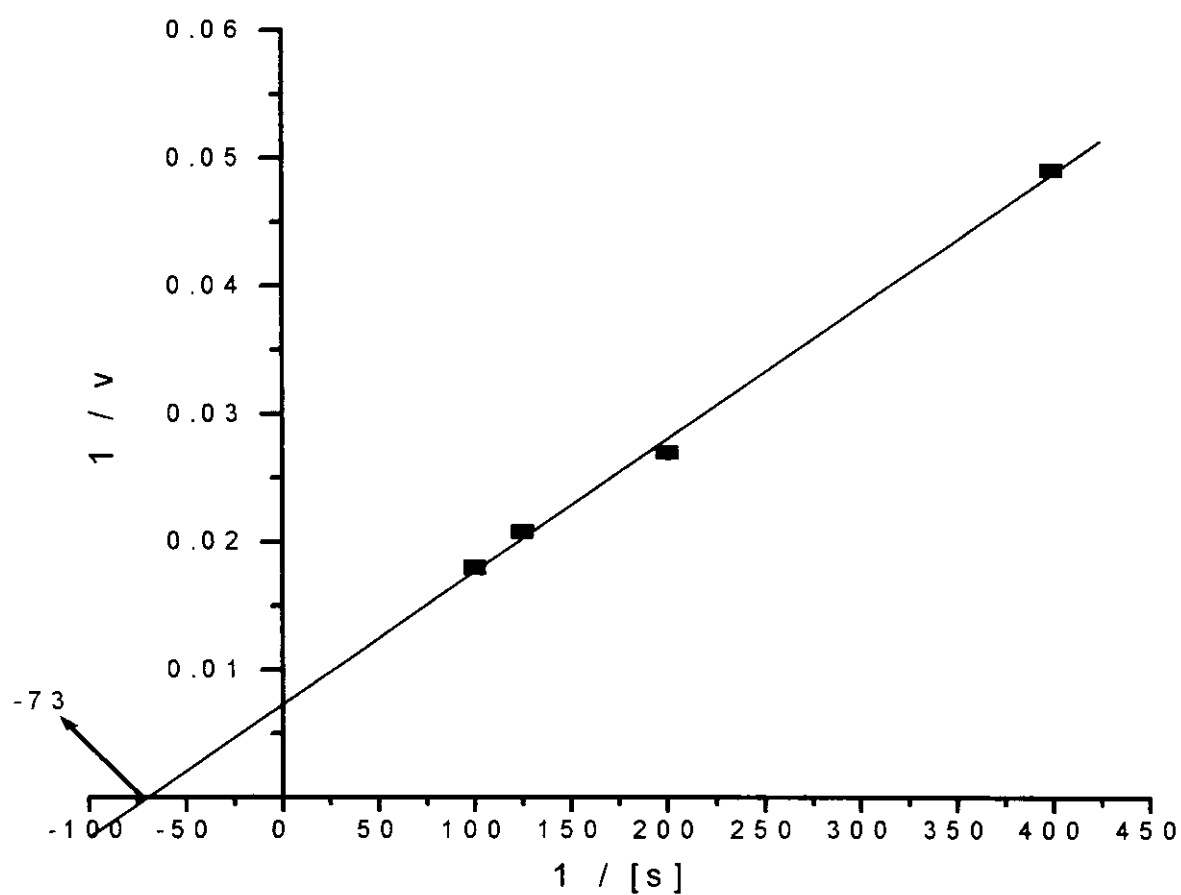


Figura XIII.20 - Gráfico de Lineweaver-Burk obtido para folhas de caruru.
Valor de $K_m' = 1,36 \times 10^{-2}$ mol/L.

Através destes gráficos, pode-se constatar que a faixa útil deste reator é de $2,5 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L e o valor aparente de K_m para estas folhas é de $1,36 \times 10^{-2}$ mol/L. Embora as folhas de caruru tenham se mostrado como uma boa alternativa para obtenção da enzima oxalato oxidase, possui a desvantagem da sua rápida degradação. Este mesmo reator no entanto pode ser útil para análise de oxalato em amostras que contenham altas concentrações de oxalato, como espinafre e algumas variedades de capim.

O valor encontrado de K_m' discorda do valor encontrado por Mongkolisirikieat e Srisuwan⁽⁴⁸⁾ que é de $2,1 \times 10^{-5}$ mol/l, à temperatura de 35 a 50°C. Isto pode ser devido à diferença de temperatura utilizada, uma vez que neste trabalho foi de 25°C, pela natureza do solo das regiões (Brasil e Tailândia) e da forma de imobilização da enzima utilizada (imobilizada em tecidos vegetais e na forma purificada).

Parte D

Conclusão

e

Perspectivas Futuras

Capítulo XIV

Conclusão

Pelos resultados obtidos com o biossensor potenciométrico, verificou-se que a imobilização enzimática via radiação gama aumenta o tempo de vida útil da enzima, o que possibilita seu uso por tempo mais prolongado tornando-se assim, viável a relação custo/ benefício. A utilização do talo de beterraba como suporte para imobilização enzimática mostrou-se adequado por ser um material facilmente encontrado, de baixo custo e por auxiliar a prolongar a atividade da oxalato oxidase.

O ambiente de irradiação é muito importante, visto que a presença de oxigênio inibe a formação de radicais livres, reduzindo a formação de ligações covalentes entre o suporte e a enzima. Dessa forma, quanto menor a quantidade de oxigênio presente, melhor a imobilização. Esta, foi obtida mais adequadamente em ambiente de argônio. Já o ambiente de solução tampão para irradiação, provavelmente forma mais espécies variadas de radicais que podem causar a desnaturação enzimática além de inibir a ligação entre a enzima e o suporte.

Além do ambiente de irradiação, verificou-se que há um compromisso com a temperatura e a dose de irradiação, para que se obtenha melhor imobilização com o máximo de estabilidade e o mínimo de perda de atividade da enzima.

A imobilização por oclusão em pasta de carbono mostrou ser mais adequado para análise de amostras pois possui faixa útil entre $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L e que com o uso de mediadores eletrônicos, como o azul de metileno e o azul de meldola, possibilitou abaixar o potencial aplicado para detecção de peróxido de hidrogênio de +700 mV, para -50 mV e +60 mV, respectivamente. Isto, facilita a eliminação de espécies eletroativas

normalmente presentes em potenciais mais elevados, embora não elimina a interferência causada pela presença de ácido ascórbico.

O método FIA possibilitou a utilização de maior quantidade de enzima, que os biossensores com o material biológico diretamente acoplado dessa maneira ele é o mais adequado para determinar as constantes cinéticas da enzima “*in natura*”. Pelo valor de K_m determinado para folhas de caruru ($1,36 \times 10^{-2}$ mol/L) e pela sua faixa útil de $2,5 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L, que é maior que a faixa útil do biossensor amperométrico com os mediadores, ($1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L), fica evidenciado que a enzima “*in natura*” possui menor atividade por mg de material.

Capítulo XV

Perspectivas Futuras

1. Explorar a imobilização enzimática via radiação gama utilizando temperaturas inferiores a 0°C, em ambiente de argônio e construir um biossensor potenciométrico verificando sua faixa útil, bem como seu K_m , as possíveis interferências e o seu tempo de vida útil.
2. Construir biossensor amperométrico com a enzima imobilizada por método de oclusão em pasta de carbono, substituindo o nujol por parafina, a fim de reduzir a interferência causada por ácido ascórbico.
3. Imobilização do azul de metileno em um suporte carregado negativamente como a sílica funcionalizada com óxido de titânio-fosfato eliminando a lixiviação desta para a solução eletrolítica.
4. Construção de reator enzimático com material biológico menos suscetível a degradação, como o talo de beterraba, com a enzima purificada imobilizada sobre este com o mediador eletrônico também imobilizado sobre este suporte, diminuindo assim, o potencial aplicado, os possíveis interferentes e aumentando a durabilidade e a sensibilidade do reator enzimático.

Referências Bibliográficas

- (1) Burg, R. von; *J. Appl. Toxicology* **1994**, 14(3), 233-237.
- (2) Raghavan, K.G.; Devasagayam, T.P.A.; *Clin. Chem.* **1985**, 31(4), 649.
- (3) Hodgkinson, A.; *Clin. Chem.* **1972**, 16 (7), 547-557.
- (4) Zerwekh, J.E.; Drake, E.; Gregory, J.; Griffith, D.; Hofmann, A.F.; Menon, M.; Pak, C.Y.C.; *Clin. Chem.* **1983**, 29(11), 1977-1980.
- (5) Menon, M.; Mahle, C. J.; *Clin. Chem.* **1983**, 29, 369-371.
- (6) Skottty, D.R. ; Nieman, T.A.; *J. Chromatography B.* **1995**, 665, 27-36.
- (7) Park, K. Y.; Gregory, C. J.; *Clin. Chem.* **1980**, 26, 1170-1172.
- (8) Reddy, S.M.; Higson, S.P.J.; Christie, I.M.; Vadgama, P.M.; *Analyst* **1994**, 119(5), 949-952.
- (9) Rolton, H.A.; McConnell, K.N.; Modi, K.S.; Macdougall, A.I.; *Clin. Chim. Acta* **1989**, 182, 247-254.
- (10) Hodgkinson, A. In *Oxalic Acid in Biology and Medicine*; Academic Press, London, 1977; p 96.
- (11) Mazzuchin, A.; Michelutti, L.; Falter, H.; *Clin. Biochem.* **1990**, 23, 173-177.
- (12) Winqvist, F.; Danielsson, B.; Malpote, J.-Y.; Persson, L.; Larsson, M.-B.; *Anal. Letters* **1985**, 18(B5), 573-588.
- (13) Hansen, E.H.; Winther, S.K.; Gundstrup, M.; *Anal. Letters.* **1994**, 27(7), 1239-1253.
- (14) Fonong, T.; *Anal. Chim. Acta.* **1986**, 186, 301-305.

-
- (15) Lehninger, A.L. In *Bioquímica*; ed. Edgard Blücher; 2^a ed.; vol.1; São Paulo, 1993; Cap VIII.
- (16) Voet, D. ; Voet, J.G. In *Biochemistry*; John Wiley & Sons, Inc., 2nd edition, New York, 1995; Cap XII e XIII.
- (17) Gorton, L.; Csöregi, E.; Domingues, E.; Emnéus, J.; Jörsson-Petersson, G.; Marko-Varga, G.; *Anal. Chim. Acta.* **1991**, 250, 203-248.
- (18) Segel, I. H. In *Biochemical Calculations*; John Wiley & Sons, Inc., 2nd edition, New York, 1976; Cap IV.
- (19) Wold, F. In *Macromoléculas: estrutura e função*; Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 1975; Cap II.
- (20) Klibanov, A. M.; *Anal. Biochem.* **1979**, 93(1), 1-25.
- (21) Wiseman, A.; *Chem. in Britain.* **1994**, 7, 571-573.
- (22) Oliveira Neto, G. de ; Yamanaka, H.; *Química Nova.* **1988**, 11(4), 432-435.
- (23) Scouten, W.H.. In *Solid Phase Biochemistry*; John Wiley & Sons, Inc., vol. 66, New York, 1983; p 260.
- (24) Rover Jr., L., “*Construção e Avaliação de Biossensor Potenciométrico para determinação de uréia, com eletrodo ion-seletivo a amônio, usando Canavalia Brasiliensis como fonte enzimática*”, Dissertação de Mestrado, UNICAMP, 1995
- (25) Anazawa, T.A., “*Imobilização por radiação gama de fase estacionária líquida sobre suporte de sílica para uso em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*”, Dissertação de Mestrado, UNICAMP, 1992
- (26) Doretto, L.; Gattolin, P.; Lora, S.; *Anal. Letters.* **1994**, 27(13), 2455-2470.
- (27) Schuler, G.; Kuphal, K.; Khalaf, A.-N.; Petersen, K.-G.; Kerp, L.; *J. of Immunol. Methods.* **1989**, 116, 27-29.

-
- (28) Scheller, F.; Schubert, F.; Pfeiffer, D.; Hintsche, R.; Dransfeld, I.; Renneberg, R.; Wollenberger, U.; Riedel, K.; Pavlova, M.; Kühn, M.; Müller, H.-G.; Tan, P. m.; Hoffmann, W.; Moritz, W.; *Analyst*. **1989**, 114(6), 653-662.
- (29) Laskin, A. I. In *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology*; The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California, 1985; Cap. X.
- (30) Vadgama, P.; Crump, P. W.; *Analyst*. **1992**, 117(11), 1657-1670.
- (31) Moses, P. R.; Wier, L.; Murray, R. W.; *Anal. Chem.* **1975**, 47, 1882.
- (32) Cass, A. E. G. In *Biosensors: A Practical Approach*; Oxford University Press, New York, 1990; Cap II.
- (33) Boyer, P. D.; *The Enzymes: oxidation-reduction*; part B, 3rd edition, vol. XII, New York, 1975; 422.
- (34) Chiriboga, J.; *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* **1963**, 11(4), 277-282.
- (35) Kobos, R. K.; Ramsey, T.A.; *Anal. Chim. Acta*. **1980**, 121, 111-118.
- (36) Potezny, N.; Bais, R.; O'Loughlin, P.D.; Edwards, J.B.; Rofe, A.M.; Conyers, R.A.J.; *Clin. Chem.* **1983**, 29(1), 16-20.
- (37) Kubota, L. T., "Síntese, Caracterização e algumas propriedades do óxido de titânio (IV) enxertado sobre superfície de sílica gel", Tese de Doutorado, UNICAMP, 1993.
- (38) Kubota, L. T.; Gouvea, F.; Andrade, A.N.; Milagres, B.G.; Oliveira Neto, G. de; *Electrochimica Acta*. **1995**, 40, aceito para publicação.
- (39) Guilbault, G.G.; Shu, F.R.; *Anal. Chem.* **1972**, 44(13), 2161-2166.
- (40) Kubota, L.T.; Milagres, B.G.; Reis, E.L.; Oliveira Neto, G. de ; *J. Flow Injection Anal.* **1995**, 12(2), 223-226.
- (41) Gorton, L.; *Electroanalysis*. **1995**, 7(1), 23-45.
- (42) Uchiyama, S.; Umetsu, Y.; *Anal. Chim. Acta*. **1991**, 255, 53-57.

-
- (43) Obzansky, D.M.; Richardson, K.E.; *Clin. Chem.* **1983**, 29(10), 1815-1819.
- (44) Glazier, S.A.; Rechnitz, G.A.; *Anal. Letters.* **1989**, 22(15), 2929-2948.
- (45) Wang, J.; Lin, M.S.; *Anal. Chem.* **1988**, 60, 1545-1548.
- (46) Inamdar, K.V.; Tarachand, U.; Devasagayam, T.P.A.; Raghavan, K.G.; *Anal. Letters.* **1986**, 19, 1987-1999.
- (47) Assolant-Vinet, C.H.; Bardeletti, G.; Coulet, P.R.; *Anal. Letters.* **1987**, 20(4), 513-527.
- (48) Mongkolisirikieat, S.; Srisuwan, C.; *J. Sci. Soc. Thailand.* **1987**, 13, 169-177.
- (49) Leek, A.E.; Butt, V.S.; *Biochem. J.* **1972**, 128, 87p.
- (50) Mascini, M.; Cremisini, C.; *Anal. Chim. Acta.* **1978**, 97, 237-244.
- (51) Varalakshmi, P.; Lathika, K. M.; Raghavan, K.G.; Singh, B.B.; *Biotech. and Bioeng.* **1995**, 46, 254-257.
- (52) Doretto, L.; Ferrara, D.; Lora, S.; *Bios. & Bioelect.* **1993**, 8, 443-450.
- (53) Bose, S.; Pattnaik, S.; Sahu, K.K.; Batta, D.; *Radiochim. Acta.* **1995**, 68, 257-261.
- (54) Bonnefont-Rousselot, D.; *J. Chim. Phys.* **1994**, 91, 968-983.
- (55) Hutchinson, F.; *Annual Rev. of Nucl. Sci.* **1963**, 13, 535-564.
- (56) Hajizadeh, K.; Halsall, H.B.; Heineman, W.R.; *Anal. Chim. Acta.* **1991**, 243, 23-32.
- (57) Cai, X.; Ogorevc, B.; Tavcar, G.; Kalcher, K.; *Electroanalysis.* **1995**, 7(7), 639-643.
- (58) Cai, X.; Kalcher, K.; Kölbl, G.; Neuhold, C.; Diewald, W.; Ogorevc, B.; *Electroanalysis.* **1995**, 7(4), 340-345.