

***Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química***



***Desenvolvimento de um biossensor amperométrico
para oxalato***

**Dissertação de Mestrado
apresentada à Comissão de
Pós-Graduação do Instituto
de Química da Unicamp
como requisito para a
obtenção do título de Mestre
em Química Analítica**

Aluna : Elizabeth Fátima Perez

Orientador : Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

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

609501009



Agradecimentos

- Ao Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota pela orientação, pelos inúmeros conselhos e principalmente pela amizade nestes anos todos de convívio.
- Ao Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto pela co-orientação, pelas dicas e pelas diferentes histórias que descontraíam e ensinavam.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste trabalho e pela concessão da bolsa de estudo.
- À direção do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) pelas condições para a realização deste trabalho.
- Aos professores e funcionários do Instituto de Química da Unicamp, pela ajuda tanto na minha formação acadêmica como na realização deste trabalho.
- Aos meus companheiros de laboratório pela convivência: Antônio (Jequié), Arnaldo, Cleidiane, Éric, Helena, Jaqueline, Julio, Karin, Laércio, Lolô, Marcelo, Miyuki, Nidi, Paulo Augusto, Paulo Fidêncio, Percy, Regina, Rogério, Sérgio, Silvio, Tânia, Túlio, Valter, Vilarinho.
- A Noemi por toda sua amizade e apoio nos momentos mais difíceis nestes anos de convivência, que prova que a distância não é desculpa para os amigos se afastarem.
- As amigas Bete e Simone pela companhia diária nos almoços, pelas diversas brincadeiras e conversas e, principalmente pela amizade.
- A Christiane, Luciane, Pilar, Silvia, Eduardo, Guilherme, Ivanildo, Patrício pela amizade e carinho.

Resumo

Título: "Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para oxalato"

Autora : Elizabeth Fátima Perez

Orientador : Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

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

Palavras-chave : eletrodo quimicamente modificado, biossensor, oxalato, oxalato oxidase.

Nesta dissertação empregou-se duas matrizes inorgânicas: sílica gel modificada com óxido de titânio (ST) e fosfato de zircônio (FZ), sobre as quais foram imobilizados dois mediadores, o azul de metileno (AM) e o azul de toluidina (AT). Estes materiais deram origem a quatro eletrodos do tipo pasta de carbono, que foram caracterizados quanto a resposta em diferentes eletrólitos, pH e estabilidade. Os eletrodos mostraram comportamento diferentes nos eletrólitos suporte estudados. Ambas matrizes revelaram carácter ácido, deslocando o potencial médio para valores mais positivos, cerca de 250 mV para STAT, 300 mV STAM, 550 mV FZAT e FZAM a pH 7. Além disso, o potencial médio desses corantes manteve-se independente do pH do meio, ao contrário do observado para os mediadores em solução. Esse efeito foi menos pronunciado para a matriz ST, visto que com ambos mediadores, o potencial não se mantém constante abaixo de pH 4. Os eletrodos estudados foram estáveis quanto a ciclagem consecutiva.

Objetivando a determinação de oxalato utilizou-se o eletrodo com AT adsorvido sobre a matriz ST e duas enzimas a oxalato oxidase, que catalisa a oxidação do oxalato a CO₂ e H₂O₂, e a Horseradish peroxidase que reduz o peróxido a água, amplificando o sinal. O biossensor apresentou melhor resposta em tampão succinato/ KCl pH 3,8, aplicando-se um potencial de -100 mV vs ECS. A curva analítica obtida nestas condições apresentou uma faixa de resposta linear de 0,1 a 2 mmol L⁻¹, cuja equação ajustada para esse intervalo

com $n= 20$, foi $i=0,33(\pm 0,04)+2,29(\pm 0,04)[\text{oxalato}]$, $r= 0,9978$, sendo i em μA e $[\text{oxalato}]$ em mmol L^{-1} . O biossensor foi estocado em geladeira apresentando um tempo de vida útil de quatro dias. Na aplicação em amostras de espinafre obteve-se uma diferença de 7 a 13% em relação ao método da AOAC, no entanto o biossensor desenvolvido apresenta como grande vantagem a diminuição em 3 dias do tempo de análise sem geração de resíduos químicos.

Abstract

Title: "Development of an amperometric biosensor for oxalate"

Author : Elizabeth Fátima Perez

Adviser : Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

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

Key-words : chemically modified electrode, biosensor, oxalate, oxalate oxidase.

In this work silica gel modified with titanium oxide (ST) and zirconium phosphate (FZ) were used, on which two mediators methylene blue (AM) and toluidine blue (AT) were immobilised. These materials originated four electrodes of the carbon paste type which performances were studied at different electrolytes, pH and stability. The electrodes showed different behaviours in the employed supporting electrolytes. Both matrices showed an acid character shifting the midpoint potential toward more positive values about 250 mV for STAT, 300 mV STAM, 550mV FZAT and FZAM at pH 7. Moreover, the midpoint potential of these dyes was independent of the solution pH, differently when not immobilised. A weaker effect for ST was observed once the midpoint potential did not keep constant for pH below 4. The electrodes studied showed stability on the continuous cycling.

With the objective of determination of oxalate, it was used the electrode containing AT adsorbed on ST and two enzymes: oxalate oxidase, which catalyses the oxidation from oxalate to CO₂ and H₂O₂ and horseradish peroxidase, which makes reduction from peroxide to water, amplifying the signal. The biosensor showed better response in succinate buffer/KCl at pH 3.8, with an applied potential of -100 mV vs SCE. The analytic curve obtained in these conditions showed linear response range between 0.1 and 2 mmol L⁻¹, fit by the equation $i = 0.33 (\pm 0.04) + 2.29 (\pm 0.04)[\text{oxalate}]$, $r = 0.9978$ for $n = 20$, where i is in μA and $[\text{oxalate}]$ is in mmol L^{-1} . The biosensor was stored in a refrigerator and presented a useful lifetime of four days. In the application of this biosensor for the determination of oxalate in

spinach samples, it was obtained a difference of 7 to 13% in comparison to the AOAC method. The developed biosensor shows as a great advantage to decrease in the analysis time of 3 days, without chemical residues generation.

Abreviaturas:

Sigla	Significado
AM	azul de metileno
AOAC	Association of Official Analytical Chemist
AT	azul de toluidina
E_a	potencial de pico anódico
E_c	potencial de pico catódico
E_{apl}	potencial aplicado
EPC	eletrodo de pasta de carbono
EQM	eletrodo quimicamente modificado
FZ	fosfato de zircônio
FZAM	azul de metileno adsorvido em fosfato de zircônio
FZAT	azul de toluidina adsorvido em fosfato de zircônio
GA	glutaraldeído
GCDI	grafite em pó ativado com carbodiimida
GCP	grafite com Horseradish peroxidase imobilizada via carbodiimida
HRP	Horseradish peroxidase
i_{pa}	corrente de pico anódico
i_{pc}	corrente de pico catódico
OXO	oxalato oxidase
SCE	eletrodo de referência de calomelano saturado
ST	sílica gel modificada com óxido de titânio (sílica titânio)
STAM	azul de metileno adsorvida em sílica titânio
STAT	azul de toluidina adsorvida em sílica titânio
STTO	oxalato oxidase imobilizada sobre STAT via glutaraldeído

Sigla	Significado
U	<i>OXO</i> : definida como quantidade de enzima necessária para formar 1 μ mol de H ₂ O ₂ /min <i>HRP</i> : definida como quantidade de enzima necessária para consumir 1 μ mol de H ₂ O ₂ /min frente ao pirogalol velocidade de varredura

CURRICULUM VITAE

1-Dados Pessoais:

Nome : Elizabeth Fátima Perez
Nascimento: 14/09/1974 **Local :** Campinas-SP
Identificação : RG 22.553.477-0

2-Escolaridade:

Superior

Entidade- "Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP"
Curso- Bacharelado Química Tecnológica
Formatura- Dezembro/1997

Médio

Entidade-"Escola Técnica Estadual Conselheiro Antônio Prado-ETECAP"
Curso- Técnico em Bioquímica
Formatura- Novembro/1992

3-Experiência Profissional:

Estágio curricular técnico

Empresa- "Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP"
Unidade-"Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Agrícolas e Biológicas"
Área- Laboratório de Fitoquímica
Período- Janeiro/1993 a Fevereiro/1994

Iniciação Científica

Empresa- "Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP"
Unidade- "Instituto de Química"
Área- Laboratório de Química Analítica
Período- Agosto/1995 a Janeiro de 1998

4-Publicações:

Perez, E. F.; Kubota, L. T.; Tanaka, A. A.; Oliveira Neto, G.; "Anodic oxidation of cysteine by nickel tetrasulphonated phthalocyanine immobilized on silica gel modified with titanium (IV) oxide"; *Electrochim. Acta*; 43 (12-13), 1998, 1665.

Perez, E. F.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T.; Tanaka, A. A.; "*Electrochemical sensor for hydrazine based on silica modified with nickel tetrasulphonated phthalocyanine*"; *Electroanalysis*; 10, 1998, 111.

Schiavo, D. A.; Perez, E. F.; Kubota, L. T.; "*Estudo eletroquímico do azul de metileno adsorvido sobre sílica gel quimicamente modificada com óxido de nióbio*", aceito para publicação na Química Nova.

Perez, E. F.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T.; "*Bi-enzymatic amperometric biosensor for oxalate*", submetido a publicação em *Sensors and Actuators B*.

5- Trabalhos publicados em Anais de Congressos:

X Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE), realizado em São Carlos-SP de 27 à 30 de Outubro de 1996. "*Eletroxidação catalítica de cisteína com ftalocianina de níquel imobilizada sobre superfície de sílica gel modificada*"; apresentado em seção coordenada, EM08.

Elizabeth Fátima Perez, Lauro Tatsuo Kubota, Auro A. Tanaka, Graciliano de Oliveira Neto

XI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE), realizado em Maragogi-AI de 5 à 9 de Abril de 1999. "*Propriedades eletroquímicas do azul de toluidina imobilizado em fosfato de zircônio*", painel PO36.

Elizabeth Fátima Perez, Lauro Tatsuo Kubota, Graciliano de Oliveira Neto

"*Estudo eletroquímico do azul de metileno adsorvido sobre sílica gel modificada com óxido de nióbio*", painel PO96.

Débora de Almeida Schiavo, Elizabeth Fátima Perez, Lauro Tatsuo Kubota.

6- Participação em congressos:

19ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), realizada em Poços de Caldas-MG de 27 à 30 de Maio de 1996. "*Comportamento voltamétrico da ftalocianina de níquel imobilizada sobre sílica gel modificada com óxido de titânio*"; seção de ; painel EQ-009

Elizabeth Fátima Perez, Lauro Tatsuo Kubota, Auro A. Tanaka, Graciliano de Oliveira Neto

20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), realizada em Poços de Caldas-MG de 24 à 27 de Maio de 1997. "*Oxidação eletrocatalítica da hidrazina pela ftalocianina de níquel imobilizada sobre sílica gel modificada*"; seção de eletroquímica eletroanalítica; painel EQ-31.

Elizabeth Fátima Perez, Lauro Tatsuo Kubota, Auro A. Tanaka, Graciliano de Oliveira Neto

"Cinética de fotodegradação do verde de malaquita em solução aquosa e em matriz polimérica", seção de ensino de química; painel ED-51.

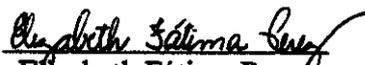
Elizabeth Fátima Perez, Silvia Vaz Guerra, Luciana Gonzaga de Oliveira, Marcelo Ganzaroli de Oliveira.

10º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), realizado em Santa Maria-RS de 31 de Agosto à 3 de Setembro de 1999. *"Influência da matriz inorgânica no comportamento eletroquímico do azul de metileno"*, sessão de eletroquímica painel EL2.

Elizabeth Fátima Perez, Graciliano de Oliveira Neto, Lauro Tatsuo Kubota.

"Determinação simultânea de salicilato, ácido úrico e ácido ascórbico utilizando espectrofotometria UV-Vis e calibração multivariada.", sessão de quimiometria painel QM-34.

Elizabeth Fátima Perez, Márcia Miguel Castro Ferreira, Lauro Tatsuo Kubota.


Elizabeth Fátima Perez

Dedico esse trabalho aos meus pais

Inês e Camilo

*O caminho da vida pode ser o da liberdade e da beleza, porém nos extraviamos. A
cobiça envenenou a alma dos homens...levantou no mundo as muralhas do ódio... e tem-se feito
marchar a passo de ganso para a miséria e os morticínios. Criamos a época da velocidade, mas
nos sentimos enclausurados dentro dela. A Máquina, que produz abundância, tem-nos
deixado em penúria. Nossos conhecimentos fixaram-nos céticos; nossa inteligência, empedernidos
e cruéis. Pensamos em demasia e sentimos pouco. Mais do que máquinas, precisamos de afeição e
doçura. Sem essas virtudes a vida será de violência, tudo será perdido.*

Chaplin.

A posse do saber não é nada se antes não
vier compreensão e vontade
de se dar carinhosamente.

Índice

Lista de Tabelas	i
Lista de Figuras	ii
<i>I-Introdução</i>	
I-A- Eletrodos Quimicamente Modificados	1
I.A.1- Matrizes	2
I.A.1.1-Sílicas	2
I.A.1.2- Fosfatos	3
I.A.2-Mediadores	5
I.B - Biossensores	6
I.B.1-Métodos de imobilização de enzima	10
I.B.1.1-Adsorção	12
I.B.1.2-Oclusão	12
I.B.1.3-Ligação cruzada ("cross-linking")	13
I.B.1.4-Ligação covalente	14
I.B.1.5-Encapsulação	14
I.C.-Oxalato	15
I.C.1- Métodos de quantificação de oxalato	16
I.C.1.1-Métodos não enzimáticos	17
I.C.1.2-Métodos enzimáticos	18
I.D-Enzimas	20
I.D.1-Oxalato oxidase	20
I.D.2-Horseradish peroxidase	20
<i>Objetivos</i>	21
<i>II-Parte Experimental</i>	
Materiais	23

Métodos	24
II.1-Síntese das Matrizes	24
II.1.1- Matriz fosfato de zircônio (FZ)	24
II.1.2- Matriz sílica titânio (ST)	24
II.1.2.1- Caracterização da matriz ST	25
II.2-Obtenção do material para confecção do eletrodo	25
II.2.1- Adsorção dos mediadores nas matrizes	26
II.2.2- Caracterização do material adsorvido	26
II.3-Medidas eletroquímicas	26
II.3.1-Preparação do eletrodo de pasta de carbono modificado	27
Caracterização eletroquímica do transdutor	28
II.3.2- Estudo da influência do eletrólito suporte	28
II.3.3-Estabilidade do eletrodo	29
II.3.4-Efeito do pH do meio	29
II.3.5-Efeito da concentração do eletrólito suporte	29
II.4-Construção e avaliação do biossensor para oxalato	30
II.4.1-Escolha do transdutor para a construção do biossensor	30
II.4.2- Imobilização da enzima oxalato oxidase (OXO) por ligação cruzada.....	31
II.4.3- Imobilização da enzima Horseradish peroxidase (HRP) pelo método de ligação covalente.....	31
II.4.3.1- Ativação do grafite com carbodiimida	31
II.4.3.2- Imobilização da enzima Horseradish peroxidase	31
II.4.4- Construção do biossensor	32
II.4.4.1- Determinação do melhor pH para resposta enzimática.....	32

II.4.4.2- Escolha do potencial aplicado	32
II.4.4.3- Curva analítica	33
II.4.4.4- Tempo de vida do biossensor	33
II.4.4.5- Estudo de interferentes	33
II.4.4.6- Aplicação do biossensor em amostras	33

III-Resultados e Discussão

III.A- Caracterização do material	36
III.A.1- Caracterização da matriz sílica titânio (ST)	36
III.A.2- Caracterização dos mediadores adsorvidos nas matrizes.....	37
III.B- Caracterização eletroquímica dos transdutores	37
III.B.1- Efeito dos ânions e cátions do eletrólito suporte	37
III.B.1.1- Estudo com eletrodo contendo FZAT	38
III.B.1.2- Estudo com eletrodo contendo FZAM	40
III.B.1.3- Estudo com eletrodo contendo STAT	42
III.B.1.4- Estudo com eletrodo contendo STAM	44
III.B.2- Efeito do pH do eletrólito suporte	45
III.B.3- Estabilidade dos transdutores	46
III.B.4- Concentração do eletrólito suporte	47
III.C- Construção do biossensor	48
III.C.1- Escolha do transdutor para a construção do biossensor.....	48
III.C.2- Avaliação do biossensor para oxalato	50
III.C.2.1- Influência do potencial aplicado	52
III.C.2.2- Efeito da solução tampão.....	53

III.C.2.3- Influência do pH na resposta do biossensor	54
III.C.2.4- Curva analítica	55
III.C.2.5- Interferentes	57
III.C.2.6- Avaliação do biossensor com amostra real	58
<i>IV-Conclusões</i>	60
<i>V-Propostas Futuras</i>	63
<i>VI-Referências Bibliográficas</i>	65

Lista Tabelas

Tabela II.1- Condições de adsorção dos mediadores nas matrizes.....	26
Tabela III.1- Resultados obtidos para a dosagem dos mediadores adsorvidos nas duas matrizes.....	37
Tabela III.2- Potencial médio obtido para o eletrodo de pasta de carbono em KCl 0,5 mol L ⁻¹ pH 7,0, v=10 mV s ⁻¹	38
Tabela III.3- Potenciais médios e ΔE obtidos com os diferentes íons estudados para o eletrodo contendo FZAT, v= 10 mV s ⁻¹	40
Tabela III.4- Potenciais médios e ΔE obtidos com os diferentes íons estudados para o eletrodo contendo FZAM, v= 10 mV s ⁻¹	41
Tabela III.5- Potenciais médios e ΔE obtidos com os diferentes íons estudados para o eletrodo contendo STAT, v= 10 mV s ⁻¹	43
Tabela III.6- Potenciais médios e ΔE obtidos com os diferentes íons estudados para o eletrodo contendo STAM, v= 10 mV s ⁻¹	44
Tabela III.7- Influência do pH do tampão succinato 0,1 mol L ⁻¹ /0,4 mol L ⁻¹ KCl na resposta do biossensor bienzimático, 100 μmol L ⁻¹ de oxalato, E _{apl} = -100 mV vs ECS.....	55
Tabela III.8- Comparação do teor de oxalato obtido com biossensor e método padrão.....	59

Lista Figuras

Figura I.1- Superfície da sílica gel, A- silanol isolado, B- siladiol, C- silanotriol, D- vicinais.....	3
Figura I.2- Estrutura do fosfato de zircônio.....	4
Figura I.3- Estruturas dos medidores. A- azul de toluidina, B- azul de metileno, C- flavinas.....	6
Figura I.4- Desenho esquemático dos componentes de um biossensor.....	7
Figura I.5- Esquema do mecanismo de detecção de um biossensor de primeira geração. A) detecção do produto formado, B) sinal gerado pelo consumo do substrato.....	8
Figura I.6- Esquema do mecanismo de detecção de um biossensor de segunda geração. A) regeneração da enzima pelo mediador, B) detecção de produtos catalisado pelo mediador.....	9
Figura I.7- Esquema do mecanismo de detecção de um biossensor de terceira geração.....	10
Figura I.8- Métodos de imobilização de enzima, A- oclusão, B- encapsulação, C- adsorção, D- ligação covalente, E- ligação cruzada.....	11
Figura I.9- Esquema da imobilização via glutaraldeído.....	13
Figura I.10- Estrutura do ácido oxálico.....	15
Esquema 1- Ciclo catalítico das enzimas naturais para degradação de oxalato, a-oxalato oxidase, b- oxalato descarboxilase.....	18
Esquema 2- Ciclo catalítico da peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e agente redutor (AH ₂).....	21
Figura II.1- Esquema da cela eletroquímica utilizada nas medidas. 1 e 2) borbulhador de gás argônio, 3) entrada eletrodo de referência ECS, 4) entrada eletrodo de trabalho, 5) entrada eletrodo auxiliar e 6) local de injeção da amostra.....	27

Figura II.2- Esquema do eletrodo de trabalho. No destaque pode-se ver como a cavidade do eletrodo foi preenchida quando utilizado a matriz FZ, A) pasta de grafite, B) pasta de grafite + FZAM (ou FZAT), C) pasta de grafite + STAT (ou STAM) disperso no meio da pasta.....	28
Figura III.1- Espectros de Fluorescência de Raio-X para misturas de sílica gel e óxido de titânio, obtidos no espectrômetro Spectrace 5000.....	36
Figura III.2- Voltamogramas obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com FZAT. Solução 0,5 mol L ⁻¹ pH 7, $v=10\text{ mV s}^{-1}$	39
Figura III.3- Gráfico de corrente de pico vs velocidade de varredura, eletrodo modificado com FZAT, A) ânions, B) cátions.....	41
Figura III.4- Gráfico de corrente de pico vs velocidade de varredura, eletrodo modificado com FZAM, A) ânions, B) cátions.....	42
Figura III.5- Processo redox do mediador azul de metileno.....	45
Figura III.6- Variação do potencial médio em função do pH da solução KCl 0,5 mol L ⁻¹ , $v=10\text{ mV s}^{-1}$. A) AM, B) AT.....	46
Figura III.7- Estabilidade do eletrodo de pasta de carbono modificada com FZAT, $v=10\text{ mV s}^{-1}$, KNO ₃ 0,5 mol L ⁻¹ pH 7.....	47
Figura III.8- Resposta do eletrodo de pasta de carbono modificada, A) FZAT em KCl 0,5 mol L ⁻¹ pH 7, A) STAT em NaAc 0,5 mol L ⁻¹ pH 4.....	48
Figura III.9- Mecanismos de detecção do biossensor. A) desoxigenado, B) oxigenado.....	49
Figura III.10- Curvas analíticas para peróxido de hidrogênio obtida com eletrodo de pasta de carbono. 1) tampão succinato 0,1 mol L ⁻¹ / 0,4 mol L ⁻¹ KCl pH=3,8; 2) tampão citrato 0,1 mol L ⁻¹ / 0,4 mol L ⁻¹ KCl pH 3,8. $v=10\text{ mV s}^{-1}$	50

Figura III.11- Mecanismo de resposta proposto para o biossensor bienzimático para oxalato.	51
Figura III.12- Curva analítica obtida com o biossensor bienzimático OXO/HRP preparado com, A) ST, B) STAT. $E_{apl} = -100 \text{ mV s}^{-1}$..	52
Figura III.13- Curva de potencial obtida para o biossensor bienzimático, em tampão succinato $0,1 \text{ mol L}^{-1} / 0,4 \text{ mol L}^{-1}$ KCl pH 3,8, $[\text{oxalato}] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$	53
Figura III.14- Curvas analíticas obtidas com eletrodo bienzimático OXO/HRP, A) tampão succinato $0,1 \text{ mol L}^{-1} / 0,4 \text{ mol L}^{-1}$ KCl pH=3,8, B) tampão citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1} / 0,4 \text{ mol L}^{-1}$ KCl pH 3,8. $E_{apl} = -100 \text{ mV vs ECS}$	54
Figura III.15- Curva de calibração obtida com o biossensor bienzimático em tampão succinato $0,1 \text{ mol L}^{-1} / 0,4 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,8, $E_{apl} = -100 \text{ mV vs ECS}$	55
Figura III.16- Tempo de resposta do biossensor bienzimático.	56
Figura III.17- Curvas analíticas do biossensor bi-enzimático para oxalato, obtidas em tampão succinato $0,1 \text{ mol L}^{-1} / \text{KCl } 0,4 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,8, $E_{apl} = -100 \text{ mV}$	57
Figura III.18- Resposta do biossensor bienzimático para oxalato em tampão succinato $0,1 \text{ mol L}^{-1} / 0,4 \text{ mol L}^{-1}$ pH=3,8, $E_{apl} = -100 \text{ mV vs ECS}$ A) ausência e B) presença de ácido ascórbico 1:1	58

I-INTRODUÇÃO

I.A- Eletrodos Quimicamente Modificados

Na década de 70 surgiu uma nova classe de eletrodos denominados eletrodos quimicamente modificados (EQM). Esse termo foi primeiramente utilizado por Murray *et al.*¹ para designar eletrodos que contivessem espécies químicas ativas, deliberadamente imobilizadas em suas superfícies, com objetivo de controlar a natureza da interface eletrodo/solução. Eles apresentavam novas características e propriedades que impulsionaram as técnicas eletroquímicas, permitindo o desenvolvimento de sensores mais seletivos².

Os EQM's começaram a ganhar destaque por possibilitarem a detecção de substâncias em regiões mais amplas de potencial, nas quais os eletrodos de mercúrio não podiam ser empregados (regiões positivas)³, além de permitirem a diminuição do sobrepotencial, minimizando o nível de interferentes nas análises⁴. O desenvolvimento desses tipos de eletrodos pode conceder a substituição de técnicas polarográficas, o que é muito importante do ponto de vista ambiental, dada a toxicidade do mercúrio.

Os primeiros EQM's estudados foram construídos a partir da modificação da superfície de eletrodos tidos como inertes tais como ouro, platina, carbono, sobre os quais foram depositados óxidos e polímeros, que conferiam novas propriedades a estes⁵. Essa modificação podia ser por adsorção, ligação covalente, recobrimento com membranas permeáveis ou por formação de compósitos².

No processo de modificação por formação de compósitos foram utilizadas superfícies de carbono em pó, originando os eletrodos de pasta de carbono (EPC)⁶⁻⁸. Eles são constituídos de hidrocarbonetos e grafite, podendo ter ou não modificadores (matrizes e mediadores). O primeiro tem como função dar consistência a pasta de carbono, geralmente são óleos não condutores (nujol, parafina, silicone). O grafite em pó utilizado deve apresentar tamanho de partícula inferior a 20 µm, para facilitar o ajuste da superfície, evitando a presença de ruído devido a alta rugosidade, além de permitir uma melhor preparação da pasta³.

Os EPC's, em relação aos outros eletrodos, apresentam vantagens como, baixa corrente de fundo, ampla faixa de potencial de trabalho, superfície facilmente renovável, além de permitirem a incorporação de suportes e mediadores que aumentam a variedade de aplicações, superando problemas como, a baixa reprodutibilidade e baixa resistência a solventes orgânicos, visto que os hidrocarbonetos utilizados para dar consistência à pasta são facilmente dissolvidos em ambiente apolar, ocorrendo a destruição do eletrodo⁹.

I.A.1- Matrizes :

A incorporação de matrizes (ou suportes) na pasta amplia a variedade dos EPC's, pois elas auxiliam a imobilização de mediadores solúveis em meio aquoso aumentando a estabilidade desses eletrodos, bem como suporte de imobilização para enzimas¹⁰. Elas podem ser isolantes tais como, as sílicas¹¹ ou zeólitas¹², ou condutoras, como os fosfato de zircônio¹³ ou fosfato de titânio¹⁴.

I.A.1.1-Sílicas:

A sílica gel caracteriza-se por um material poroso não cristalino, cuja estrutura consiste em uma rede de grupos tetraédricos de $[\text{SiO}_4]$ sendo sua superfície formada por dois tipos de grupos, os siloxanos ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$) e os silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$)¹⁵. Os grupos silanóis apresentam-se em diferentes formas na superfície da sílica e de acordo com a sua estrutura são denominados de isolados, vicinais, silanodiol e silanotriol como pode ser visto na **Figura I.1**.

Esta matriz tem sido muito utilizada, pois oferece grandes vantagens frente a outras, devido a alta resistência mecânica, química e térmica conferindo maior robustez ao eletrodo, além da elevada área superficial permitindo que uma maior quantidade de mediador seja incorporada sobre a superfície¹⁶.

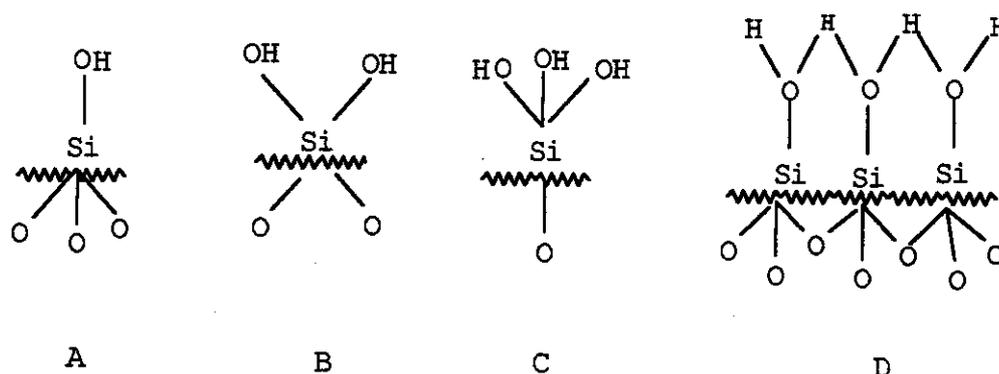


Figura I.1- Superfície da sílica gel, A-silanol isolado, B-siladiol, C- silanotriol, D- vicinais

A sílica gel tem despertado interesse devido a possibilidade de modificação da superfície através de inorgano ou organofuncionalização¹⁷, ocorrendo o enxerto de grupos inorgânicos ou orgânicos, respectivamente, como a modificação da sílica com óxido de zircônio¹⁸ e grupo imidazol¹⁹. Nestas modificações os grupos silanóis são os sítios reativos, devido aos hidrogênios ionizáveis, que são substituídos pelos grupos de interesse. Os grupos siloxanos geralmente não sofrem reação, pois são muito estáveis necessitando de uma grande energia de ativação para reagir²⁰.

Essas modificações conferem novas características a matriz, tais como: maior acidez, sítios propícios para a adsorção de mediadores e propriedades de pré-concentração²¹. As matrizes modificadas influenciam no comportamento dos mediadores nela adsorvidos atribuindo-os novas propriedades.

I.A.1.2- Fosfatos:

O fosfato de zircônio²² tem despertado interesse há mais de 20 anos, em parte devido a sua forma cristalina apresentar grande capacidade de troca iônica, acidez e condutividade²³, e também pelas inúmeras formas de fases de cristalização conhecidas desse composto. O original bis-monohidrogenofosfato de zircônio é

obtido como gel, cristais simples ou estágios intermediários de cristalinidade, sendo a capacidade trocadora de íons função da estrutura e cristalinidade²⁴.

A forma cristalina, denominada de α -fosfato de zircônio, apresenta a fórmula estequiométrica $Zr(HPO_4)_2 \cdot H_2O$ e é preparada pelo refluxo do gel do composto (forma amorfa) com ácido fosfórico. O espectro de difração de raio-X revelou que o composto possui estrutura lamelar, na qual o metal fica próximo ao plano fazendo pontes com os oxigênios dos grupos fosfatos, localizados acima e abaixo do plano do metal. Nessa estrutura, três dos átomos de oxigênio do grupo fosfato estão ligados a três diferentes átomos de zircônio, formando um triângulo equilátero distorcido. Os átomos de zircônio estão octaedricamente coordenados com o oxigênio em um rearranjo hexagonal²⁴ como pode ser visto na **Figura I.2**.

A capacidade de trocar íons, como dito anteriormente, depende fortemente da maneira como o composto é preparado, tanto na forma cristalina como na amorfa. Os materiais amorfos são obtidos pela rápida adição de íons fosfato às soluções de sais de zircônio. Na sua síntese prefere-se o uso de ácido fosfórico concentrado para evitar contaminação de íons estranhos no meio do composto. O envelhecimento do gel na água mãe de cristalização aumenta a proporção de íons fosfato no sólido²⁴.

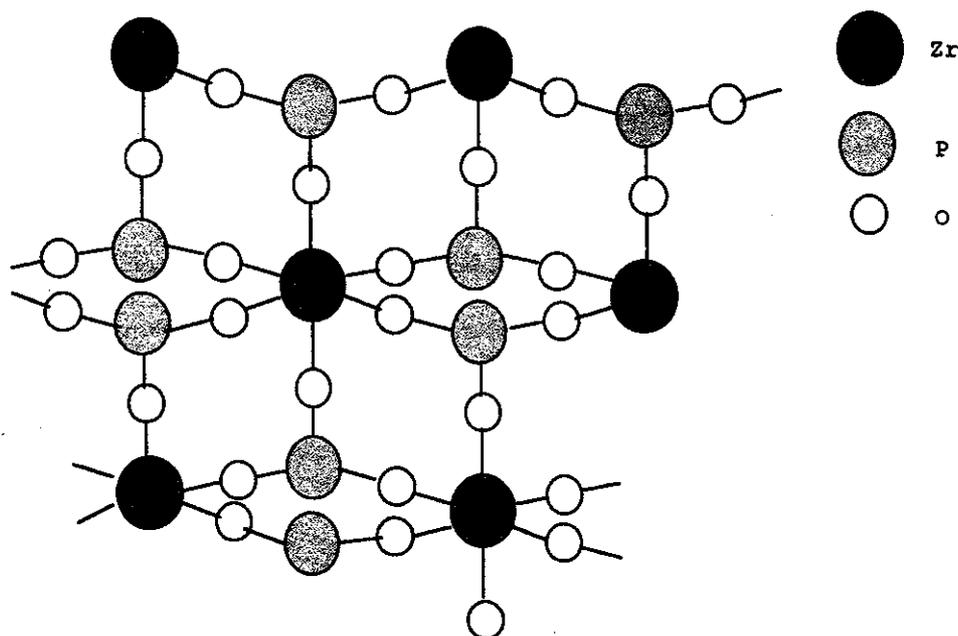


Figura I.2- Estrutura do fosfato de zircônio.

Essa propriedade trocadora iônica associada com a estrutura lamelar que o fosfato de zircônio apresenta, permite que esse composto possua condutividade de íons. Essa condutividade ocorre apenas no sentido das lamelas, assim o transporte dos íons é limitado pela presença de água e pelo impedimento estérico²³.

Embora as propriedades trocadoras iônicas sejam mais acentuadas para a forma cristalina do fosfato de zircônio, a forma amorfa apresenta maior distância lamelar, além de possuir cavidades de diferentes tamanhos, permitindo a adsorção de mediadores no interior das camadas, sendo por isso também muito utilizada como matriz de adsorção para estudos eletroquímicos²⁵.

I.A.2-Mediadores:

Os mediadores são substâncias adicionadas aos eletrodos quimicamente modificados com a função de mediar da transferência de elétrons em um processo de oxido-redução²⁶. Em vários casos, a transferência de elétrons em um processo redox é a etapa lenta da reação. O processo electrocatalítico tem por objetivo reduzir a energia de ativação da reação, no caso, a redução de energia ocorre pela diminuição do sobrepotencial de resposta do analito². Neste tipo de processo o mediador funciona como um electrocatalisador interagindo com o analito, diminuindo assim o potencial necessário para ocorrer a reação de resposta do mesmo e conseqüentemente o nível de interferência na análises²⁷.

Além de serem electrocatalisadores, os mediadores, em determinadas condições, podem funcionar como regeneradores de enzimas oxido-redutases interagindo com o sítio ativo da mesma, permitindo uma resposta mais rápida²⁸.

Os mediadores redox podem ser espécies orgânicas, compostos organometálicos e complexos inorgânicos. Corantes orgânicos da classe das fenazinas (safranina), fenoxiazinas²⁹ (azul de meldola, azul do Nilo) e fenotiazinas³⁰ (azul de metileno, azul de toluidina) têm recebido especial atenção pela semelhança

de estrutura com as flavinas, Figura I.3. Assim eles têm sido utilizados como compostos modelos para estudos eletroquímicos dessas substâncias.

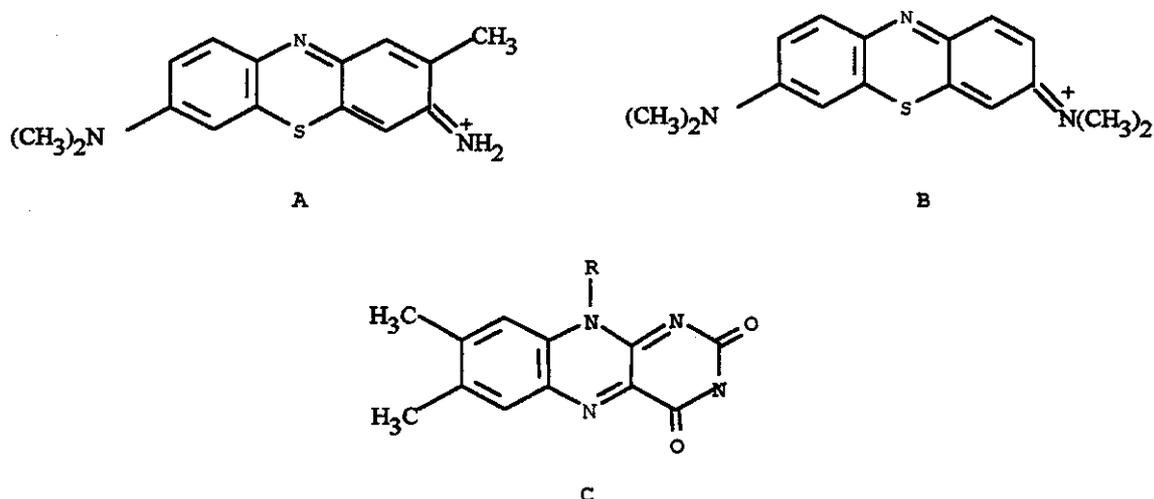


Figura I.3-Estruturas dos medidores. A- azul de toluidina, B- azul de metileno, C- flavinas.

O azul de metileno é muito utilizado como desinfetante, indicador de oxidação-redução e como corante em bacteriologia³¹.

Os EPC's, devido as vantagens e a grande versatilidade, como a inclusão de matrizes, mediadores e enzimas, vêm sendo muito aplicado no desenvolvimento de sensores e biossensores³²⁻³⁴.

I.B - Biossensores

O termo biossensor é aplicado a sistemas que empregam como componente de reconhecimento um composto biológico incorporado ao transdutor, sendo uma das suas principais características a seletividade, a qual provém da alta seletividade do biorreconhecedor na interação com o analito³⁵. Tais propriedades fazem com que haja muitos estudos no sentido do desenvolvimento dos biossensores para o

monitoramento em tempo real, que é de grande interesse econômico, clínico e ambiental. A sua aplicação é importante nas áreas médica (análises clínicas), farmacêutica e industrial, pois permitem uma redução dos custos das análises e diminuição de resíduos gerados durante uma análise. Os biossensores são constituídos por um detector, um transdutor e um amplificador de sinal³⁶ **Figura I.4.**

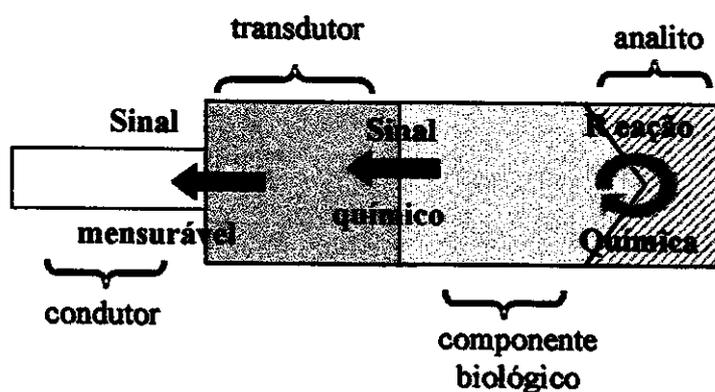


Figura I.4- Desenho esquemático dos componentes de um biossensor.

O transdutor é o componente do biossensor que possui a função de transformar o sinal gerado no processo de reconhecimento (reação química) em um sinal mensurável. Eles são classificados de acordo com o mecanismo de transdução³⁶⁻³⁷: *piezelétrico* (alteração de massa), *óptico* (absorção, fluorescência, reflectância), *eletroquímico* (corrente, condutividade, potencial), *calorimétrico* (calor), etc. Dependendo do tipo de transdutor utilizado no biossensor será empregado um amplificador de sinal diferente.

Outro componente é o reconhecedor que é responsável pela detecção do analito, no caso dos biossensores podem ser anticorpos (imunossensor), DNA, enzimas entre outros³⁵. Estes componentes devem estar imobilizados no transdutor, sendo esta etapa realizada de diversas maneiras, tais como: oclusão, ligação cruzada ou covalente³⁸, as quais serão discutidas adiante. A possibilidade de reutilizar o

componente biológico é que tem despertado o interesse no desenvolvimento desses sensores, visto que este processo diminui o custo das análises.

O primeiro biossensor surgido na década de 60, desenvolvido por Updike e Hichs³⁹, utilizava a enzima glicose oxidase imobilizada em uma membrana de acrilamida. A enzima no seu ciclo catalítico transformava a glicose em ácido glicônico e peróxido de hidrogênio com o consumo de oxigênio do meio. O sistema de resposta quantificava a variação da concentração de oxigênio, que por sua vez era proporcional à concentração de glicose. Estes biossensores nos quais a variação da concentração de um dos substratos da enzima ou dos produtos da reação enzimática era detectada diretamente sobre um eletrodo são chamados de biossensores de primeira geração³⁸. Um esquema do mecanismo de detecção desses biossensores pode ser visto na **Figura I.5**.

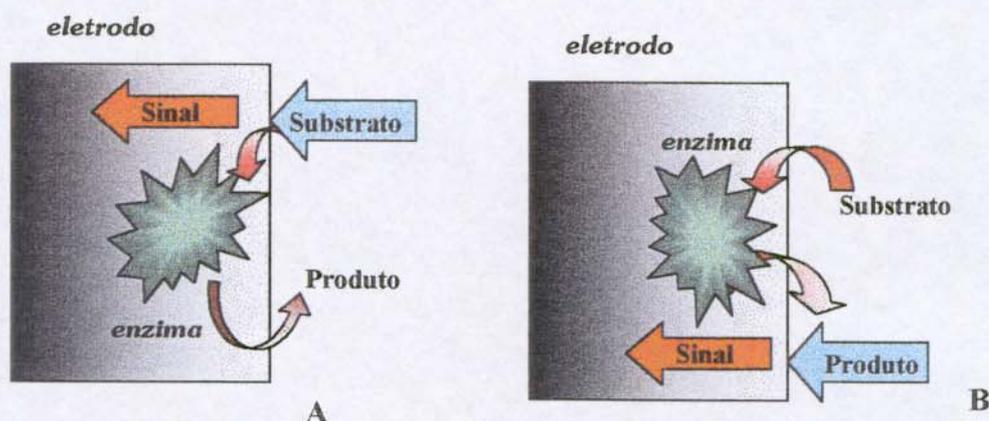


Figura I.5- Esquema do mecanismo de detecção de um biossensor de primeira geração. A) sinal gerado pelo consumo do substrato, B) detecção do produto formado

Embora os biossensores de primeira geração apresentassem boas respostas, no caso das desidrogenases em que a resposta é em função da redução ou oxidação eletrocatalítica do NADH, o potencial aplicado era muito elevado, implicando em um elevado número de interferentes⁴⁰. Uma alternativa para resolver esse problema, da qual originou os biossensores de segunda geração, foi a imobilização conjunta de mediadores redox e enzimas. Isto possibilitou, a regeneração da enzima ou a

diminuição do potencial aplicado para detecção dos produtos da reação enzimática, minimizando os interferentes³⁸. A resposta obtida é referente ao processo redox do mediador, **Figura I.6**.

Apesar da diminuição do número de interferentes com a adição de mediadores, a interação enzima/mediador não é tão simples, dependendo ainda, da proximidade dos dois para que ocorra a transferência de elétrons⁴¹. Assim, a orientação durante o processo de imobilização é um passo fundamental na procura por sistemas mais simples e eficientes para a construção dos biossensores de segunda geração. Atualmente, tem-se buscado biossensores cuja resposta seja referente a regeneração direta da enzima pelo eletrodo, sem a necessidade da inclusão de mediadores (terceira geração)³⁸. A resposta assim obtida é em função da oxidação da enzima na superfície do eletrodo, **Figura I.7**.

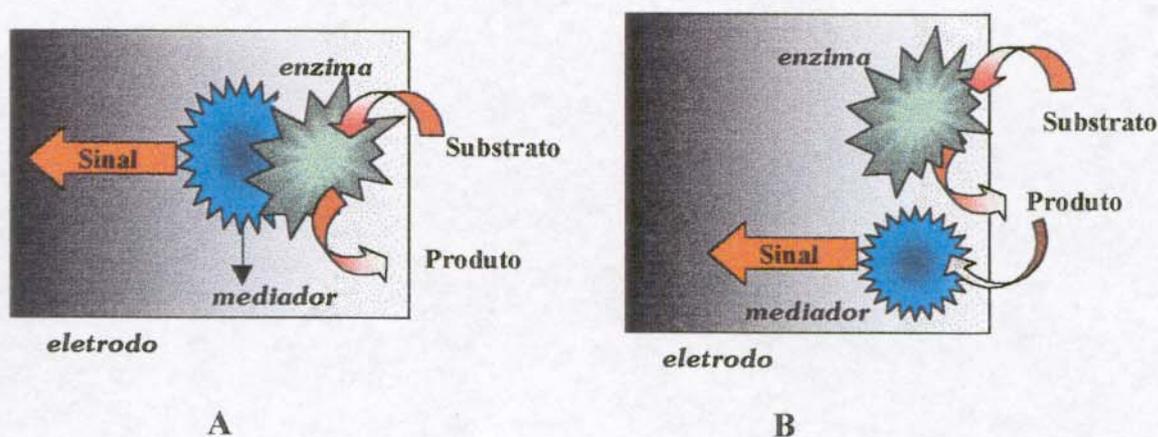


Figura I.6- Esquema do mecanismo de detecção de um biossensor de segunda geração. A) regeneração da enzima pelo mediador, B) detecção de produtos catalisado pelo mediador.

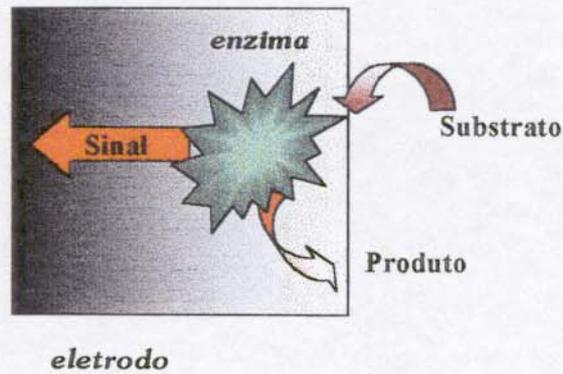


Figura I.7- Esquema do mecanismo de detecção de um biossensor de terceira geração.

I-B.1-Métodos de imobilização de enzimas:

A possibilidade de imobilização de enzima é um dos principais pontos que tornam a pesquisa com biossensores interessante, pois permite que a enzima seja reutilizada em diversas análises, diminuindo o custo das mesmas.

Na construção dos biossensores a etapa mais crítica é a da imobilização da enzima, ou do componente biológico, pois é dela que dependerá o bom desempenho e estabilidade do sensor. Além disso, a orientação do centro ativo da enzima deve ser tal que permita a proximidade com o eletrodo (ou mediador) para que ocorra a transferência de elétrons e a enzima seja regenerada. Não existe um método ideal ou procedimento geral para a imobilização do componente biológico, porém a diversidade dos métodos existentes permite a escolha de um que promoverá uma melhor imobilização e menor perda de atividade enzimática³⁸. Dentre os mais importantes destacam-se: ligação cruzada covalente, oclusão, adsorção e encapsulação^{36,38}, **Figura I.8**

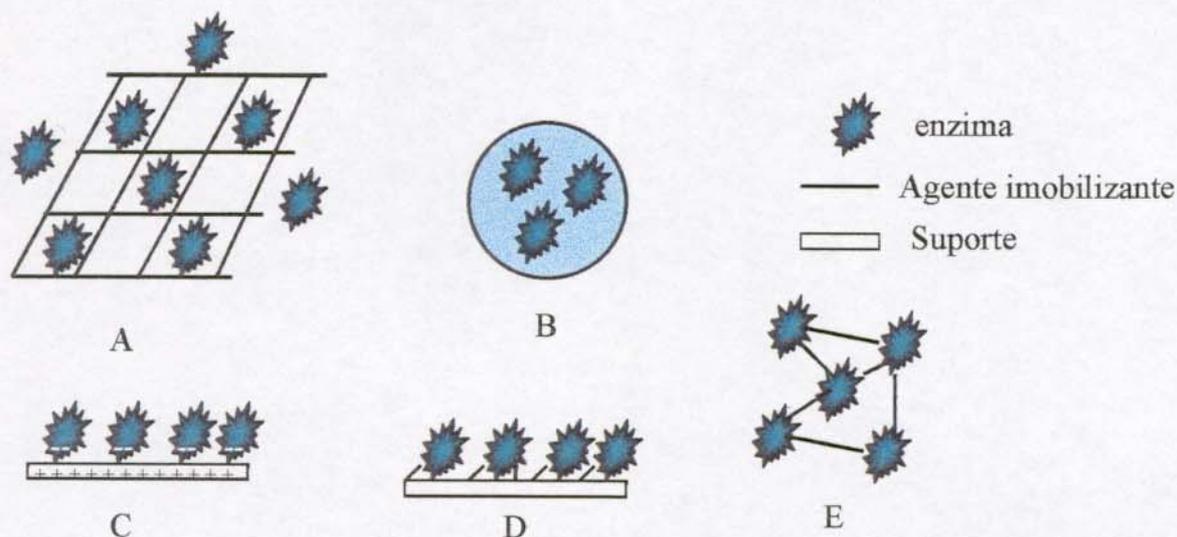


Figura I.8- Métodos de imobilização de enzima, A- oclusão, B- encapsulação, C- adsorção, D- ligação covalente, E- ligação cruzada³⁸.

Quando a enzima está em solução seu comportamento é igual ao de qualquer outro soluto, há uma dispersão na solução e os movimentos são completamente livres, já imobilizada esses movimentos estão mais restritos³⁸.

A escolha do material suporte deve levar em consideração o método de imobilização e a aplicação desse material. Algumas propriedades devem ser observadas para a escolha da matriz, tais como, características físicas (área superficial, não compressibilidade, resistência, forma e grau de porosidade), químicas (hidrofilicidade, característica inerte, grupos funcionais passíveis de modificação), estabilidade (mecânica e de estocagem), segurança (biocompatibilidade, toxicidade), aspectos econômicos (custo-benefício, impacto ambiental, equipamentos e reagentes requeridos) e reação (limitações de transferência de massa de substância, cofatores e produtos)³⁸.

I.B.1.1-Adsorção:

A adsorção é um método de imobilização que ocorre principalmente através de interações eletrostáticas tais como ligações de hidrogênio e iônicas, forças de van der Waals^{36,38} as quais são fracas, mas ocorrem em número suficiente para que a imobilização seja possível.

A grande vantagem deste processo é que não há a necessidade de reagente adicional, às vezes apenas ativação do suporte, sendo por isso um dos métodos menos destrutivos para a cadeia da proteína. Além disso, são rápidos, simples e baratos e a sua reversibilidade permite a regeneração do sinal do biossensor renovando-se a superfície adicionando-se mais enzima³⁶.

Apesar dessas vantagens a estabilidade das enzimas adsorvidas nesse tipo de imobilização é muito baixa, pois as interações eletrostáticas são altamente afetadas pelo pH e força iônica do meio, temperatura ou mesmo pela presença do substrato da enzima. Outras desvantagens são, impedimento estérico do suporte, sobrecarga de células ou moléculas de enzimas sobre o suporte o que pode levar a uma diminuição da atividade enzimática³⁸.

I.B.1.2-Oclusão^{35,38}:

Na oclusão a imobilização da enzima ocorre durante o processo de reticulação de um polímero, ela difere da adsorção e da ligação covalente porque a enzima fica livre na solução, mas seus movimentos estão limitados pela estrutura da rede.

A rede polimérica forma espaços vazios dentro dos quais a enzima fica alojada. Esse método possui dois grandes problemas, uma grande dificuldade de transporte do substrato e do produto, para dentro e para fora respectivamente, do polímero, aumentando o tempo de resposta e também uma perda contínua de enzima pelo poros do polímero.

I.B.1.3-Ligação cruzada ("cross-linking")^{35,38}:

Neste método de imobilização ocorre a ligação entre as moléculas de enzima para formar uma ampla estrutura tridimensional. A ligação cruzada envolve a formação de ligação covalente entre enzimas pela utilização de reagentes bi ou multifuncionais tais como glutaraldeído. Entretanto a toxicidade desses reagentes é o fator limitante para a aplicação desse método em células vivas e várias enzimas.

Um dos reagentes mais utilizados neste processo de imobilização é o glutaraldeído (GA), o qual pode imobilizar a enzima por duas formas, cujos processos são difíceis de controlar e possíveis de ocorrerem concomitantemente:

1) formação de base de Schiff (C=N) entre os grupos lisina da enzima e os aldeídos do GA. Em meio ácido as bases de Schiff são instáveis e ocorre a regeneração dos grupos aldeído e amina, assim o processo de ligação cruzada ocorre entre os grupos amina da proteína e aldeído do GA, como mostrado no esquema a seguir⁴² Figura

I.9.

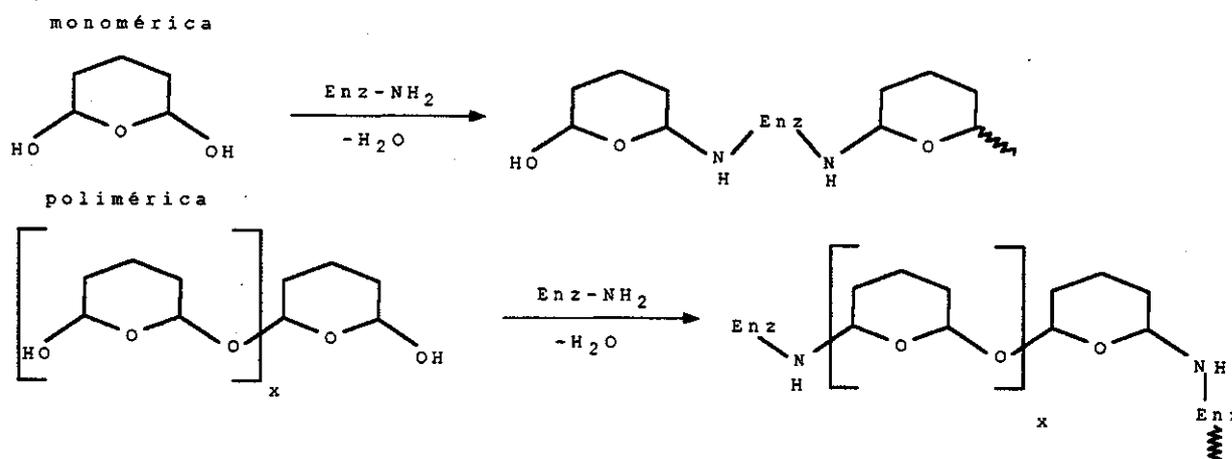


Figura I.9- Esquema da imobilização via glutaraldeído.

2) formação de rede polimérica imobilizando a enzima por oclusão. Neste caso ocorre a polimerização do GA e as moléculas da enzima ficam presas na rede, não havendo uma ligação química, mas sim física, entre enzima e GA, ficando a mesma com os movimentos limitados⁴².

I.B.1.4-Ligação covalente^{36,38}:

A imobilização por ligação covalente ocorre geralmente entre os grupos funcionais presentes na superfície da matriz e os pertencentes aos resíduos amino ácidos da superfície da enzima e que não são essenciais para a atividade enzimática. Os grupos utilizados nessa ligação são, por exemplo, os ácidos carboxílicos (ácido aspártico e glutâmico), amino (lisina e arginina), hidroxila (serina ou treonina) e mercaptana (cisteína).

Neste método dois passos estão envolvidos, o primeiro é a ativação do suporte com o reagente específico e em segundo a adição da enzima para a formação da ligação. Esse método ocorre em baixas temperaturas, baixa força iônica e dentro do pH fisiológico e se realizado na presença do substrato pode proteger a atividade enzimática. A principal vantagem desse tipo de imobilização consiste na menor probabilidade de ocorrer perda de enzima durante o seu uso.

É interessante ressaltar que na escolha do reagente de imobilização é vantajoso saber qual o amino ácido presente no centro ativo, para que o agente imobilizante não reaja com ele, como por exemplo se o ácido carboxílico for essencial para a atividade enzimática necessita-se de um reagente que se ligue ao grupo amino e assim por diante.

I.B.1.5-Encapsulação³⁸:

A enzima neste método fica envolvida por uma membrana semipermeável, similarmente à oclusão, as moléculas de enzima estão livres na solução porém limitadas no espaço. Vários materiais, tais como a celulose, tem sido usados para construir microcápsulas variando de diâmetro. Este método apresenta como principal desvantagem problemas de difusão de espécies envolvidas no processo, assim um excesso de produto pode ficar retido dentro da cápsula resultando na quebra da membrana.

I.C - OXALATO

O ácido oxálico, Figura I.10, é um analito de grande importância em análises clínicas, alimentícias⁴³ e ambientais⁴⁴, sua alta concentração na dieta do ser humano pode causar vários problemas de saúde.

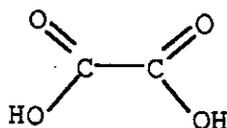


Figura I.10- Estrutura do ácido oxálico.

Nos vegetais e bactérias o oxalato funciona como um armazenador de cálcio. Quando a célula necessita de uma quantidade excedente de cálcio, enzimas quebram as moléculas de oxalato liberando o cátion desejado⁴⁵. Neste processo, a enzima oxalato oxidase apresenta como produtos finais do seu ciclo catalítico o gás carbônico e o peróxido de hidrogênio. Apesar do caracter maléfico que o peróxido pode apresentar para o meio celular, devido a formação de radicais livres, alguns artigos reportam a importância do mesmo no mecanismo de formação da parede celular durante o processo de divisão celular dos vegetais⁴⁶⁻⁴⁷. Dessa forma o oxalato é muito importante no crescimento das plantas.

Nos humanos o oxalato é adquirido por duas fontes distintas, via exógena através de alimentos ricos neste composto como é o caso do espinafre (vegetal que possui maior teor), ruibarbo, cevada entre outros⁴⁸, ou via endógena através do metabolismo do ácido ascórbico e glioxilato⁴⁹.

Uma dieta diária rica em oxalato pode levar o indivíduo a apresentar um quadro de osteoporose pela diminuição da absorção de cálcio pelo organismo, devido à complexação do cálcio da dieta com a precipitação de oxalato de cálcio ($K_{ps} = 2,3 \cdot 10^{-9}$)⁵⁰ no intestino, que conseqüentemente será eliminado nas fezes⁴⁸. Por

outro lado, se o oxalato for absorvido pelo organismo, poderá ocorrer a precipitação nos rins levando a formação de *calculus renais*⁵¹.

O *calculus renal* são formados também pela precipitação de ácido úrico e amino ácidos, principalmente cistina e glicina, sendo que o tratamento clínico preventivo difere com o tipo, nesta a importância da dosagem do oxalato na urina^{52,53}. Um indivíduo do sexo masculino normal excreta de 20-40 mg diárias e do sexo feminino 20-30 mg diárias, quantidades superiores a estas podem ser um indício de hiperoxalúria⁵⁴.

O oxalato também tem sido associado a morte de bebês prematuros, devido a deposição deste nos rins aumentando a incidência de doenças renais agudas, tais como nefritis crônica do glomérulo, pielonefritis, necrosis tubular aguda. A principal fonte do oxalato para os bebês são as soluções nutritivas parenterais, que são ricas em ácido ascórbico, que sofre oxidação, originando este composto⁵⁵.

Do ponto de vista ambiental, o oxalato juntamente com outros ácidos orgânicos como acético e fórmico, são os sub-produtos finais no processo de desinfecção por ozonólise para o tratamento de água. Atualmente suspeita-se que tais compostos sejam responsáveis pelo crescimento de bactérias no sistema de distribuição de água potável, diminuindo a qualidade da mesma⁴⁴.

Dessa maneira o oxalato é um analito de grande interesse médico, ambiental e industrial, por esses motivos o desenvolvimento de novas metodologias rápidas e eficientes para a quantificação do oxalato faz-se necessária.

I.C.1- Métodos de quantificação de oxalato:

Alguns métodos (não-enzimáticos⁵⁶⁻⁵⁷ e enzimáticos⁵⁸⁻⁶¹) têm sido propostos para a quantificação de oxalato, empregando diferentes técnicas tais como, eletroquímica⁶², espectrofotométrica⁶³⁻⁶⁵, quimiluminescente⁶⁶, fotoquímica⁶⁷ e cromatográfica⁶⁸.

I.C.1.1-Métodos não enzimáticos:

Nos métodos não enzimáticos descritos na literatura empregam-se compostos que apresentam afinidade pelo oxalato, podendo catalisar a sua decomposição a gás carbônico ou que na presença dele ocorra a inibição de uma reação.

Egashira *et al.*⁶⁹ desenvolveram um método de detecção de oxalato empregando um complexo de rutênio, o qual catalisa a decomposição do oxalato à gás carbônico. Na construção desse sensor para oxalato, o complexo de rutênio é imobilizado em uma membrana de Nafion®, a qual é colocada sobre a superfície de um eletrodo de platina. Este eletrodo modificado foi acoplado a um sensor para CO₂, cuja resposta será proporcional ao oxalato na solução. Para que ocorresse a reação entre o complexo e o oxalato foi necessário a aplicação de 0,95 V vs Ag/AgCl, o que propiciou a resposta de muitos interferentes, tais como ácido úrico, oxalacético entre outros.

Um outro método descrito na literatura consiste no emprego de Rodamina B, que possui propriedades fluorescentes e têm sido usadas em titulações argentométricas e em determinações de metais por espectrofluorimetria. Uma outra propriedade é a perda de fluorescência e da cor em soluções ácidas na presença de potássio, a qual é acelerada na presença de oxalato. Em vista dessas características Pérez-Ruiz *et al.*⁴⁸ desenvolveram um método por análise em injeção em fluxo (FLA) para a quantificação do oxalato, sendo a diminuição da fluorescência função da quantidade deste no meio.

Na análise de vegetais o método recomendado pela AOAC (Association Official of Analytical Chemistry) inclui várias etapas de precipitação de proteínas do vegetal, após as quais o oxalato é precipitado na forma de sais de cálcio. A dosagem é feita por titulação permanganométrica⁷⁰. A principal desvantagem desse método é o tempo gasto com o preparo da amostra, visto a necessidade da precipitação do oxalato puro para a titulação.

I.C.1.2-Métodos enzimáticos:

Na determinação de oxalato através do método enzimático, podem ser empregadas duas enzimas: oxalato oxidase e oxalato descarboxilase. Essas duas são encontradas em vegetais (banana, beterraba, etc.) e bactérias (*Oxalobacter formigenes*, *Pseudomonas oxaloticus*)⁷¹ e diferem pelo mecanismo de metabolismo do oxalato, as reações podem ser visualizadas no Esquema 1.



Esquema 1- Ciclo catalítico das enzimas naturais para degradação de oxalato, a- oxalato oxidase, b- oxalato descarboxilase.

O método mais utilizado na quantificação do oxalato emprega kits enzimáticos, cuja concentração é referente ao desenvolvimento de coloração, a qual é medida espectrofotometricamente ($\lambda=590 \text{ nm}$). O grande problema desse tipo de análise é que em cada experimento é necessário utilizar uma quantidade de enzima não recuperável, encarecendo as análises⁷².

Atualmente a possibilidade de imobilização das enzimas em diferentes suportes, tem permitido a sua reutilização e conseqüentemente a diminuição dos custos e garantindo a seletividade³⁶.

Os métodos descritos na literatura empregando enzimas utilizam os produtos da reação enzimática (CO_2 e H_2O_2) para quantificação do oxalato, ou monitoram o consumo de oxigênio do meio. Os biossensores assim confeccionados pertencem a 1ª geração.

Reddy *et al.*⁷³ descreveram em seu trabalho a construção de biossensor amperométrico com oxalato oxidase imobilizada entre duas membranas poliméricas semipermeáveis a peróxido de hidrogênio e oxalato. O processo de detecção é

simples: o oxalato da solução passa através da primeira membrana entra em contato com a enzima produzindo peróxido, o qual atravessa a segunda membrana, sofrendo oxidação na superfície de um eletrodo de platina polarizado à 650 mV vs Ag/AgCl. Apesar desse biossensor não apresentar interferência de ascorbato, uma vez que o mesmo não passa através da membrana, o potencial aplicado é muito elevado podendo apresentar resposta de outros componentes, permeáveis a membrana.

Um outro exemplo de biossensor para oxalato cuja detecção faz-se por peróxido é descrito por Pundir *et al.*⁷⁴ Neste trabalho a oxalato oxidase é imobilizada, utilizando glutaraldeído, sobre a superfície de pérolas de vidro (suporte). Em outra porção desse suporte foi imobilizada a enzima Horseradish peroxidase. A detecção do oxalato ocorre pela formação inicial de peróxido pela ação da oxidase, em seguida este é reduzido pela enzima peroxidase a qual é regenerada pelo 4-aminofenazona e fenol. Esta reação promove o desenvolvimento de coloração que será medida espectrofotometricamente ($\lambda=520$ nm).

Além do peróxido de hidrogênio o gás carbônico é um dos produtos da reação enzimática da oxalato oxidase, sendo por isso passível de quantificação para a determinação de oxalato. Pode-se utilizar um sensor de CO₂ para sua detecção ou pode-se fazer uso do equilíbrio ácido-base em solução. Este último método foi usado por Fernandes *et al.*⁵¹ no qual o CO₂ gerado permitia a alteração da cor indicador Bromocresol, determinada espectrofotometricamente ($\lambda=540$ nm).

Fernandes *et al.*⁷⁵ desenvolveram um reator contendo sementes Sorghum, vegetal rico em oxalato oxidase, para a detecção de oxalato sem o tratamento prévio de amostras. Neste caso, utilizou-se um sensor potenciométrico para CO₂, este era o produto da reação enzimática e o sinal obtido era proporcional ao oxalato da solução.

As enzimas mais empregadas nos métodos enzimáticos são a oxalato oxidase e Horseradish peroxidase, sendo também utilizadas neste trabalho. Dessa maneira a seguir dar-se-á algumas características delas.

I.D-Enzimas:

I.D.1-Oxalato oxidase:

A oxalato oxidase⁷⁶⁻⁷⁸ (sinônimos: aero-oxalato desidrogenase, ácido oxálico oxidase)⁷⁹ possui como código da Enzyme Commission E.C. 1.2.3.4, segundo este, o primeiro número refere-se a classe a qual a enzima pertence, o 1 é utilizado para enzimas da classe das oxi-redutases, o segundo número mostra o grupo de ação catalítica, no caso o 2 significa ação sobre o grupo carboxílico, o 3 mostra que o acceptor final de elétrons é o O₂, portanto é uma oxidase e o 4 é o número da enzima oxalato oxidase. Esta pode apresentar diferentes sítios ativos dependendo da fonte da qual é extraída, pode ser uma metaloproteína quando extraída por exemplo da *Pseudomonas sp*, ou flavoproteína se sua origem for musgo ou metalo-flavoproteína *T. controversa*⁸⁰.

Neste trabalho a oxalato oxidase utilizada é extraída de germes de cevada (Barley seedling). Um trabalho recentemente publicado revelou que esta enzima, ao contrário da maioria das oxidases, possui o metal manganês em quantidade superior ao cobre na sua composição, sendo a cinética enzimática alterada pela adição do mesmo⁸¹⁻⁸². Este fato sugere que no sítio ativo da enzima o Mn está presente participando da reação. A OXO foi caracterizada como um homopentamero de $M_r \cong 125.000$, contendo cinco grupos lisinas e um carboxílico essenciais para a atividade enzimática⁴⁶.

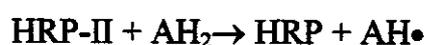
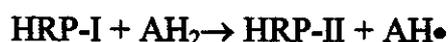
I.D.2-Horseradish peroxidase:

Peroxidases são enzimas que catalisam a oxidação de compostos orgânicos e inorgânicos pelo peróxido de hidrogênio. Existem diversas fontes de peroxidases

tanto vegetal como animal. O centro ativo da mesma quando extraída de plantas é composto pelo grupo heme (ferriprotoporfirina IX)⁸³.

A Horseradish peroxidase (E.C. 1.11.1.7) é também uma enzima da classe das oxi-redutases, subclasse peroxidase. Ao contrário da oxalato oxidase, sua composição esta bem esclarecida. Apresenta uma boa estabilidade mesmo a elevadas temperaturas.

O ciclo catalítico da HRP⁸⁴⁻⁸⁶ é muito complexo ocorrendo em diferentes etapas como pode ser visto no Esquema 2. Na presença de peróxido há a formação de um composto que foi denominado HRP-I. Este último forma a HRP-II na presença de um substrato redutor (AH₂) e regenerada a forma fundamental na presença de mais substrato redutor.



Esquema 2- Ciclo catalítico da peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e agente redutor (AH₂).

OBJETIVOS

O trabalho tem por objetivos a síntese de matrizes inorgânicas que permitem a imobilização de mediadores redox em sua superfície; estudos das propriedades de transferência eletrônica dos mediadores na superfície do eletrodo. Todas essas etapas visando a imobilização da enzima oxalato oxidase para a construção de um biossensor amperométrico para oxalato, o qual será avaliado quanto a estabilidade, sensibilidade e seletividade e amostras reais.

II-Parte

Experimental

Materials

Reagente	Procedência
Ácido acético	Nuclear
Ácido ascórbico	Merck
Ácido cítrico	Sigma
Ácido clorídrico	Merck
Ácido fosfórico	Synth
Ácido succínico	Vetec
Álcool octanólico	Merck
Azul de metileno	Ecibra
Azul de toluidina	Aldrich
Cloreto de cálcio	Ecibra
Glutaraldeído 50% (m/V)	Fluka
Grafite em pó 99,9%	BDH
Hidróxido de amônio	Nuclear
Horseradish peroxidase (E.C. 1.11.1.7) 290 U/mg	Sigma (P-8375)
Óleo mineral	Schering
Oxalato oxidase (E.C. 1.2.3.4.) 0,71 U/mg broto de cevada	Sigma (O-4127)
Oxalato de cálcio	Vetec
Oxalato de sódio	Merck (1.06.557)
Oxicloreto de zircônio	Fluka
Peróxido de hidrogênio	Merck
Sílica gel 100-200 mesh, 150 Å	Aldrich (23.682)
Tetracloroeto de carbono 99,8%	Merck
Tetracloroeto de titânio 99,9%	Aldrich (25.431.2)
Tungstato de sódio	Merck
1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida m-p toluenossulfonato	Sigma (C-1011)

Métodos

II.1-Síntese das Matrizes

Neste trabalho foram utilizadas duas matrizes diferentes, ST e FZ, que conferiram propriedades diferentes aos mediadores estudados e cuja síntese e caracterização são apresentadas a seguir.

II.1.1- Matriz fosfato de zircônio (FZ)⁸⁷:

O fosfato de zircônio foi preparado pela lenta adição de 50 mL de uma solução 0,2 mol L⁻¹ de ácido fosfórico à 50 mL de uma solução 0,1 mol L⁻¹ de oxiclureto de zircônio, ambas em ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹, com rápida agitação. O precipitado gelatinoso formado, foi lavado por decantação com água destilada até pH \cong 3,4, filtrado em papel quantitativo e seco a temperatura ambiente por uma semana.

II.1.2- Matriz sílica titânio (ST)⁸⁸:

A sílica gel quimicamente modificada com óxido de titânio foi preparada a partir da mistura de 40 g de sílica gel, ativada por seis horas à 100 °C, 10 mL de tetracloreto de titânio em 200 mL de tetracloreto de carbono e deixados em refluxo a 80 °C por sete horas. À seguir a sílica foi filtrada, lavada com CCl₄ e seca a vácuo. O material seco foi então hidrolizado por imersão em água deionizada e lavada até teste negativo para cloreto.

II.1.2.1- Caracterização da matriz ST :

O teor de óxido de titânio enxertado na superfície da sílica foi determinado por Fluorescência de Raios-X, empregando o aparelho Spectrace 5000, através de uma curva de calibração contendo misturas de sílica gel e óxido de titânio (2%, 4%, 6%, 8% e 10%). Os espectros foram obtidos com filtro de alumínio, em atmosfera de ar, sendo necessário aplicar uma corrente de 0,08 mA, 20 kV de voltagem, 6 s de pré-aquecimento, as medidas foram obtidas após 60 s de irradiação na faixa de 0 à 20 keV.

Os padrões utilizados para a construção da curva de calibração foram preparados a partir da mistura da sílica gel com óxido de titânio. Após a homogeneização da solução sólida, a mesma foi peneirada de forma que todas as amostras tivessem a mesma granulometria. A peneiragem é necessária uma vez que nessa técnica de fluorescência de raio-X este é um fator importante e uma fonte de erro.

A área superficial do material foi obtida através da análise de multipontos BET (Brunauer, Emmet, Teller) em um aparelho Micrometrics Instrument Corporation (Modelo FlowSorb II 2300), utilizando-se o nitrogênio como adsorbato.

II.2-Obtenção do material para confecção do eletrodo

O material sintetizado para a construção dos transdutores é constituído dos mediadores azul metileno (AM) ou azul de toluidina (AT) adsorvido sobre uma das matrizes FZ ou ST. Assim obteve-se quatro materiais: azul de toluidina adsorvido em fosfato de zircônio(FZAT), azul de metileno adsorvido em fosfato de zircônio (FZAM), azul de toluidina adsorvido em sílica titânio (STAT) e azul de metileno adsorvido em sílica titânio (STAT), os quais foram posteriormente caracterizados.

II.2.1- Adsorção dos mediadores nas matrizes:

As condições de adsorção dos mediadores estudados (AM e AT) nas respectivas matrizes pode ser visualizada na Tabela II.1, em todos os experimentos utilizou-se 100 mg de matriz e 25 mL de solução de mediador. Para a matriz ST foi necessária uma concentração dez vezes maior do que aquela utilizada para a FZ, pois na primeira condição não ocorria adsorção para essa matriz. O material obtido foi lavado com água destilada e deixado secar por um dia a temperatura ambiente.

Tabela II.1- Condições de adsorção dos mediadores nas matrizes.

Matriz	[Mediador] / mol L⁻¹	t /h
FZ	[AT] $1 \cdot 10^{-5}$	17
	[AM] $1 \cdot 10^{-5}$	17
ST	[AT] $1 \cdot 10^{-4}$	17
	[AM] $1 \cdot 10^{-4}$	1

II.2.2- Caracterização do material adsorvido:

Os materiais preparados de acordo com o procedimento acima foram analisados para determinar-se o teor de mediador adsorvido nas matrizes (FZ e ST), para isso utilizou-se a técnica de análise elementar e os resultados foram obtidos em triplicata em um Analisador Elementar CHSN Perkin-Elmer (Modelo 2400).

II.3-Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato PGSTAT 20 Autolab Eco Chemie, utilizando-se uma célula eletroquímica de três eletrodos,

Figura II.1, sendo o eletrodo de referência o de calomelano saturado (SCE), o auxiliar um eletrodo espiral de platina e o de trabalho o de pasta de carbono modificada. Todas as soluções foram desoxigenadas com argônio antes das medidas.

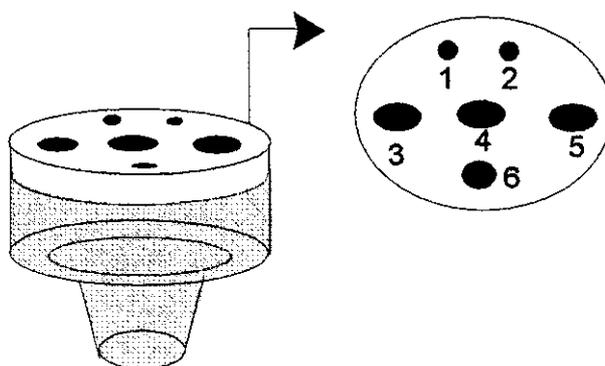


Figura II.1- Esquema da cela eletroquímica utilizada nas medidas. 1 e 2) borbulhador de gás argônio, 3) entrada eletrodo de referência SCE, 4) entrada eletrodo de trabalho, 5) entrada eletrodo auxiliar e 6) local de injeção da amostra.

II.3.1-Preparação do eletrodo de pasta de carbono modificado:

A pasta de carbono do eletrodo de trabalho foi preparada a partir da mistura do grafite e a matriz contendo o mediador, sendo utilizado gotas de óleo mineral (nujol) como aglutinante. As quantidades de matriz adsorvida com mediador e de grafite, bem como o preparo da pasta, foram otimizadas de forma que o eletrodo produzisse uma boa resposta. Assim, quando utilizada a matriz FZ necessitou-se de uma concentração de 75% (m/m) de grafite na pasta com ambos mediadores estudados (AT e AM). Para uma melhor resposta do eletrodo foi necessária a construção do eletrodo segundo a **Figura II.2**, na qual pode-se verificar que primeiro há uma pequena camada de pasta de carbono, seguida de outra contendo o material adsorvido e a pasta de carbono.

Na preparação da pasta com a ST, a matriz foi incorporada distribuída no interior de toda a pasta do eletrodo, sendo utilizado 75% (m/m) de grafite para STAT e 70% de grafite para STAM. Esse tipo de preparação do eletrodo é operacionalmente mais fácil.

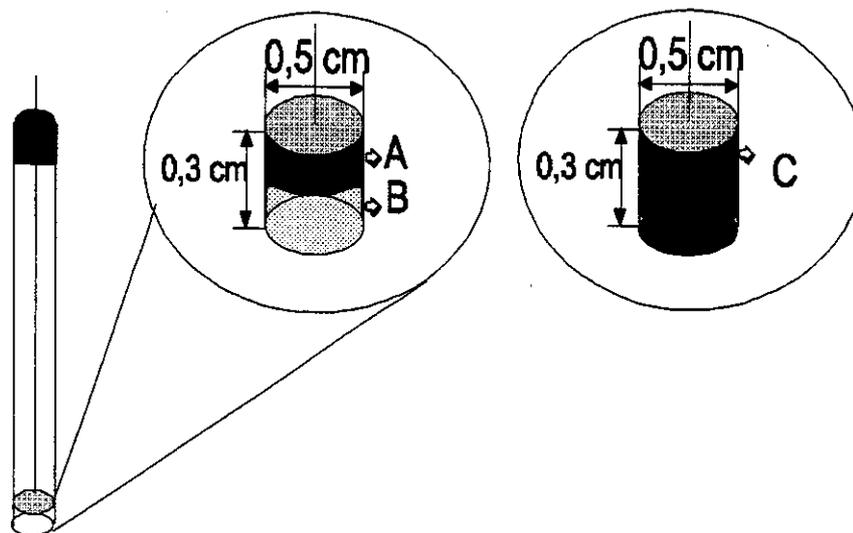


Figura II.2- Esquema do eletrodo de trabalho. No destaque pode-se ver como a cavidade do eletrodo foi preenchida, A) pasta de grafite, B) pasta de grafite + FZAM (ou FZAT), C) a cavidade foi totalmente preenchida por pasta de grafite + STAT (ou STAM).

Caracterização eletroquímica do transdutor

II.3.2- Estudo da influência do eletrólito suporte:

Os íons em solução podem afetar o desempenho do eletrodo, isto porque a difusão de cátions e ânions no meio depende do raio de hidratação e da mobilidade desses íons. Além disso, eles podem interagir com os mediadores adsorvidos ou com a matriz alterando a resposta de corrente e potencial. Estudou-se esse efeito com os ânions (Cl^- , NO_3^- , Ac^- , ClO_4^- e SO_4^{2-}), e os cátions (Na^+ , K^+ , NH_4^+ e Ca^{2+}) em diferentes velocidades de varredura (5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 mV s^{-1}). O contra-

íon dos cátions escolhido foi o cloreto para ambas matrizes, e dos ânions, o potássio para FZ e sódio para ST. A concentração de todas as soluções foi $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, sendo o pH ajustado com os ácidos e bases dos respectivos contra-íons, utilizando-se pH 7 para matriz FZ e pH 4 para ST, com o auxílio de um potenciômetro Corning 350.

II.3.3-Estabilidade do eletrodo:

Os mediadores adsorvidos podem apresentar fraca ou forte afinidade com a matriz suporte, conferindo ao eletrodo uma menor ou maior estabilidade aos eletrodos. A estabilidade do eletrodo foi verificada em todos eletrólitos suportes estudados através de ciclagem consecutivas (30 ciclos) na velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

II.3.4-Efeito do pH do meio:

No estudo do efeito do pH na resposta do eletrodo escolheu-se o eletrólito suporte com melhor sinal e por isso preparou-se soluções de cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 2,0 à 7,0 . As medidas foram realizadas à 10 mV s^{-1} utilizando-se o mesmo eletrodo. O pH foi ajustado com os ácidos e bases dos respectivos contra-íons, com o auxílio de um potenciômetro Corning 350.

II.3.5-Efeito da concentração do eletrólito suporte:

A concentração do eletrólito suporte pode influenciar na resposta de corrente do eletrodo, assim o seu efeito foi estudado em três níveis diferentes: 0,1, 0,5, 0,75 mol L^{-1} de cloreto de potássio pH 7 para a matriz FZ e pH 4 para ST. A resposta foi avaliada com o mesmo eletrodo e nas diferentes velocidades de varreduras citada no item II.3.2.

II.4-Construção e avaliação do biossensor para oxalato

O biossensor desenvolvido neste trabalho foi construído a partir da imobilização de duas enzimas, a oxalato oxidase e a Horseradish peroxidase, para cada uma utilizou-se um método diferente de imobilização, devido as características das mesmas. A primeira, a oxalato oxidase, não forneceu um sinal de corrente satisfatório para a quantificação de oxalato, assim foi necessário a utilização de uma segunda enzima, a peroxidase, para amplificar o sinal gerado.

II.4.1-Escolha do transdutor para a construção do biossensor:

Os mediadores utilizados neste trabalho possuem a propriedade de eletrocatalisar a redução de peróxido de hidrogênio, escolheu-se este método de detecção para a quantificação de oxalato. Assim, para dar continuidade ao trabalho optou-se pelo transdutor que apresentasse melhor resposta para a detecção de peróxido. A eletrorredução de peróxido foi avaliada com os quatro eletrodos caracterizados anteriormente (FZAT, FZAM, STAT, STAM), os quais foram confeccionados nas condições pré-determinadas descritas no item II.3.1. Na eletrocatalise foram utilizados dois tampões citrato 0,1 mol L⁻¹/ 0,4 mol L⁻¹ KCl pH=3,8 e succinato 0,1 mol L⁻¹/ 0,4 mol L⁻¹ KCl pH=3,8. Foram feitas adições consecutivas de uma solução de peróxido 0,1 mol L⁻¹ utilizando-se a técnica de voltametria de varredura linear.

II.4.2- Imobilização da enzima oxalato oxidase (OXO) por ligação cruzada:

A oxalato oxidase foi imobilizada na superfície da matriz ST contendo azul de toluidina adsorvido através do reagente bi-funcional glutaraldeído. Para isso misturou-se 1 mg (0,71U) de OXO dissolvido em 60 μL de solução tampão succinato 0,1 mol L^{-1} / 0,4 mol L^{-1} KCl pH=3,8, 10 mg de STAT e 3 μL de uma solução 2,5% de glutaraldeído. O material foi seco à temperatura ambiente por 3 horas e foi denominado STTO. A imobilização dessa enzima foi também realizada com solução tampão citrato 0,1 mol L^{-1} / 0,4 mol L^{-1} KCl pH=3,8.

II.4.3- Imobilização da enzima Horseradish peroxidase (HRP) pelo método de ligação covalente:

II.4.3.1- Ativação do grafite com carbodiimida⁸⁹:

Antes da imobilização da enzima peroxidase sobre o grafite é necessário a sua ativação com a carbodiimida. O procedimento utilizado foi o descrito por Gorton *et al.*⁸⁹ O grafite foi ativado pela adsorção de 2,1 mg de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida-m-p-toluenossulfonato dissolvido em solução tampão acetato 0,05 mol L^{-1} pH=4,8 em 100 mg de grafite. A mistura foi deixada reagir por 2 horas à 25⁰C. Após esse tempo filtrou-se à vácuo lavando-se cuidadosamente com água deionizada, o material resultante (GCDI) foi seco à vácuo por 2,5 horas. Este material foi estocado a seco em geladeira e pôde ser utilizado por um mês.

II.4.3.2- Imobilização da enzima Horseradish peroxidase :

Na imobilização da enzima HRP misturou-se 0,2 mg (60 U) da mesma dissolvidos em 120 μL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH=6,3, a 25

mg de GCDI e deixou-se reagindo na geladeira por 16 horas. Decorrido esse tempo o grafite com a HRP imobilizada (GCP) foi seco à vácuo por 4,5 horas.

II.4.4- Construção do biossensor:

O biossensor foi construído a partir da mistura dos materiais GCP (25 mg) e STTO (11 mg) obtidos como descrito anteriormente, para dar consistência a pasta utilizou-se gotas de nujol. O biossensor assim confeccionado foi testado nos tampões citrato e succinato, nas mesmas condições 0,1 mol L⁻¹/ 0,4 mol L⁻¹ de KCl pH 3,8, a fim de se determinar em qual solução seriam feitas as medidas subsequentes.

II.4.4.1- Determinação do melhor pH para resposta enzimática:

A atividade enzimática pode variar de acordo com o pH da solução tampão. Assim, o biossensor foi avaliado em seis diferentes valores de pH da solução tampão succinato 2,9; 3,3; 3,8; 4,3; 4,8, para identificar no qual o sistema apresentava o máximo de resposta. Para isso, utilizou-se a técnica de cronoamperometria aplicando-se um potencial de -100 mV vs SCE e fazendo-se adições consecutivas de 100 µmol L⁻¹ de oxalato de sódio.

II.4.4.2- Escolha do potencial aplicado:

O potencial de máxima resposta do biossensor foi determinado em solução tampão succinato 0,1 mol L⁻¹/ 0,4 mol L⁻¹ KCl pH 3,8, utilizando-se a técnica de cronoamperometria, fazendo-se adições consecutivas de 100 µmol L⁻¹ de oxalato de sódio aplicando-se diferentes potenciais (-50, -75, -100 e -150 mV vs SCE).

II.4.4.3- Curva analítica:

Otimizadas as condições de resposta do biossensor obteve-se a curva analítica do biossensor por cronoamperometria aplicando-se um potencial de -100 mV vs SCE em solução tampão succinato 0,1 mol L⁻¹/ 0,4 mol L⁻¹ KCl pH 3,8.

II.4.4.4- Tempo de vida do biossensor:

O tempo de vida do biossensor foi determinado pela sua estocagem em solução tampão succinato 0,1 mol L⁻¹/ 0,4 mol L⁻¹ KCl pH 3,8 em geladeira. A sua resposta foi avaliada em dias sucessivos fazendo-se curvas analíticas. A estocagem do biossensor a seco, mesmo na geladeira, promovia a perda da atividade da enzima.

II.4.4.5- Estudo de interferentes:

Um dos grandes problemas em química analítica, são os interferentes que podem atuar tanto sobre a enzima quanto sobre o sistema de detecção. Um dos maiores interferentes para a oxalato oxidase é o ácido ascórbico. A sua ação na resposta do biossensor foi avaliada fazendo-se adições consecutivas de uma mistura 1:1 de oxalato e ácido ascórbico, através da técnica de cronoamperometria aplicando-se -100 mV vs SCE.

II.4.4.6- Aplicação do biossensor em amostras:

O biossensor foi utilizado na determinação de oxalato em espinafre, seguindo o procedimento da AOAC Official Method 974.24 para ácido oxálico em vegetais⁸⁹.

Neste procedimento as folhas de espinafre são pesadas e trituradas em um liquidificador com 100 mL de água durante 15 minutos. Deste extrato bruto retira-se uma massa de 35 g e adiciona-se água até um peso total de 300 g e, a seguir, mistura-se 55 mL de HCl 6 mol L⁻¹ e duas gotas de álcool octanólico. Essa mistura é fervida por 15 minutos e depois de resfriada é transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL. Depois de completado o volume deixa-se em repouso por uma noite. A mistura é filtrada através de papel quantitativo desprezando-se os 100 mL iniciais, originando o extrato I. A 25 mL do extrato I são adicionados 5 mL de uma solução de ácido tungstofosfórico (preparada pela mistura de 2,5 g de Na₂WO₄.H₂O e 4 mL de H₃PO₄ 1,2 mol L⁻¹ diluído à 100 mL) e deixados em repouso por no mínimo 5 horas. Decorrido esse tempo, ele é filtrado, e retira-se uma alíquota de 20 mL acertando o pH entre 4 e 4,5 com NH₄OH concentrado. A esta solução adiciona-se 5 mL de solução tampão acetato pH 4,5 contendo 0,45 mol L⁻¹ de CaCl₂ deixando-se precipitar por uma noite. No dia seguinte o precipitado é centrifugado a 1700 rpm e lavado com uma solução 0,9 mol L⁻¹ de ácido acético saturado com CaCl₂. Finalmente o precipitado é dissolvido em 5 mL de H₂SO₄ (1:1) e titulado com uma solução padrão de KMnO₄ 0,02 mol L⁻¹.

Para a determinação com o biossensor, fez-se a curva de calibração e a seguir utilizou-se alíquotas dos extratos I.

III-RESULTADOS

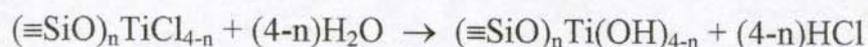
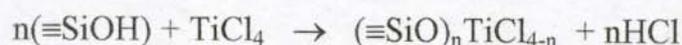
E

DISCUSSÃO

III.A- Caracterização do material

III.A.1- Caracterização da matriz sílica titânio (ST):

A síntese da sílica titânio segundo o método descrito por Kubota *et al.*⁸⁸ é realizada em dois passos, o primeiro consiste no enxerto do tetracloreto de titânio na superfície da sílica, seguido da hidrólise originando o óxido de titânio como pode ser visto na reação abaixo⁸⁸, o qual será responsável pela adsorção do mediador:



O teor de titânio enxertado na superfície da sílica foi obtido através de medidas de Fluorescência de Raios-X, utilizando-se a banda K_{α} da emissão de titânio (Figura III.1) uma vez que a mesma além de mais intensa sofre menos influência de outros elementos. O teor de titânio obtido foi de 0,7 mmol g^{-1} de sílica.

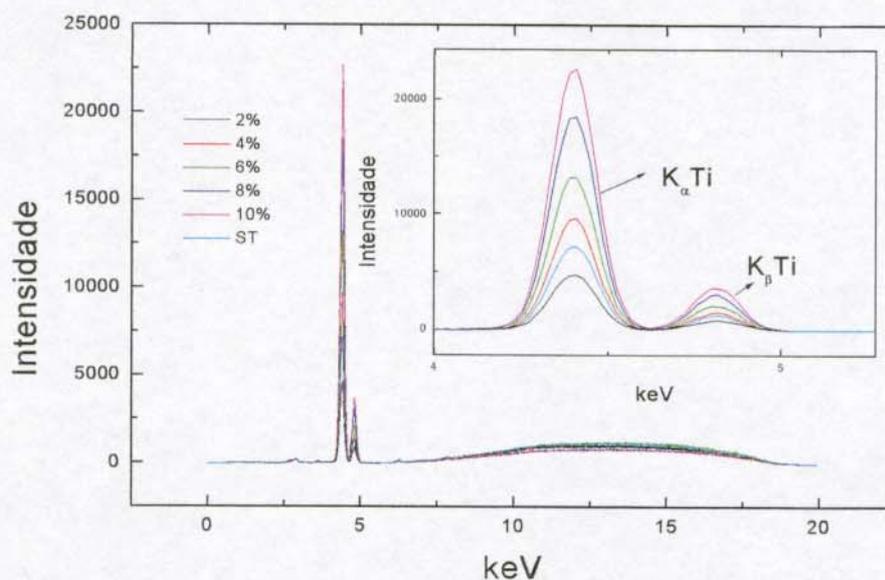


Figura III.1- Espectros de Fluorescência de Raio-X para misturas de sílica gel e óxido de titânio, obtidos no espectrômetro Spectrace 5000.

Outro parâmetro medido para a matriz ST foi a área superficial, a qual representa o espaço disponível para a adsorção de novas espécies na superfície da matriz. Através do método de multipontos BET obteve-se uma área de $353 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ de sílica modificada. Este método baseia-se na proporcionalidade entre a quantidade de nitrogênio adsorvido na superfície e a área superficial do material.

III.A.2- Caracterização dos mediadores adsorvidos nas matrizes:

Neste trabalho foram estudados dois mediadores, azul de metileno (AM) e azul de toluidina (AT), Figura I.3, adsorvidos nas matrizes sílica titânio (ST) e fosfato de zircônio (FZ). O teor de corante adsorvido na matriz foi obtido por análise elementar e a Tabela III.1 mostra uma maior afinidade da matriz FZ pelos mediadores utilizados, uma vez que para adsorção em ST foi necessária uma solução dos mediadores de concentração dez vezes superior do que a utilizada com o FZ, pois caso contrário não ocorria a imobilização do mesmo.

Tabela III.1- Resultados obtidos para a dosagem dos mediadores adsorvidos nas duas matrizes.

Material	% N	teor de corante ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de matriz)
FZAM	$0,46 \pm 0,03$	109
FZAT	$0,150 \pm 0,007$	35
STAM	$0,15 \pm 0,02$	36
STAT	$0,13 \pm 0,01$	30

III.B- Caracterização eletroquímica dos transdutores

III.B.1- Efeito dos ânions e cátions do eletrólito suporte:

O eletrólito suporte é responsável pelo balanceamento de cargas na superfície do eletrodo oferecendo mudanças no comportamento redox da espécie

eletroquímica, essas mudanças podem ser tanto no potencial de resposta quanto na corrente observada e são resultado de uma melhor ou pior interação com a matriz (ou mediador) e da difusão dos íons na solução. Dessa maneira estuda-se íons de diferentes raios de hidratação e carga, de forma a permitir avaliar o comportamento redox dos mediadores adsorvidos.

A matriz confere novas propriedades ao mediador adsorvido, e, dependendo da sua acidez, pode deslocar o potencial para valores mais positivos, conferindo ao mediador novas propriedades.

Através dos potenciais médios, E_m , ($E_m=(E_a+E_c)/2$) obtidos nas mesmas condições para as duas matrizes, Tabela III.2, nota-se que a matriz FZ possibilita um deslocamento de potencial para valores mais positivos do que a ST. Isto mostra que a primeira possui um caráter mais ácido, interagindo fortemente com o mediador, estabilizando a forma reduzida do mesmo, e, conseqüentemente, deslocando o potencial. A acidez da ST não é tão alta quanto a da FZ e por isso E_m não foi tão deslocado.

Tabela III.2- Potencial médio obtido para o eletrodo de pasta de carbono em KCl 0,5 mol L⁻¹ pH 7,0, $v=10$ mV s⁻¹.

Material	E_m /mV
FZAM	126
FZAT	130
STAM	-110
STAT	-151
AT em solução	-398
AM em solução	-426

III.B.1.1- Estudo com eletrodo contendo FZAT:

Os voltamogramas obtidos com o eletrodo preparado com FZAT apresentaram picos alargados, Figura III.2, sugerindo que as espécies eletroativas não estão adsorvidas de uma única maneira e conseqüentemente não respondem ao mesmo tempo.

O potencial médio, E_m , obtido do estudo com os diferentes ânions e cátions pode ser observado na Tabela III.3. Nela observa-se que o íon do eletrólito suporte nitrato possui uma grande afinidade pelo mediador doando densidade eletrônica, o que facilita o processo de oxidação do mediador, deslocando o potencial para valores mais negativos. Já o sulfato e o cloreto, estabilizam melhor a forma reduzida, permitindo que o potencial do mediador desloque para valores mais positivos. O potencial observado para a solução de perclorato pode ser resultado de sua baixa mobilidade, devido ao tamanho do íon, o que pode ser verificado pelo seu alto valor de ΔE . Quando o eletrólito suporte era acetato o eletrodo não mostrou resposta, este fato pode ser devido a uma baixa afinidade entre íon e mediador ou devido a baixa porosidade do FZ e o grande raio de hidratação do acetato, não permitindo o balanceamento de cargas, prejudicando a resposta do eletrodo.

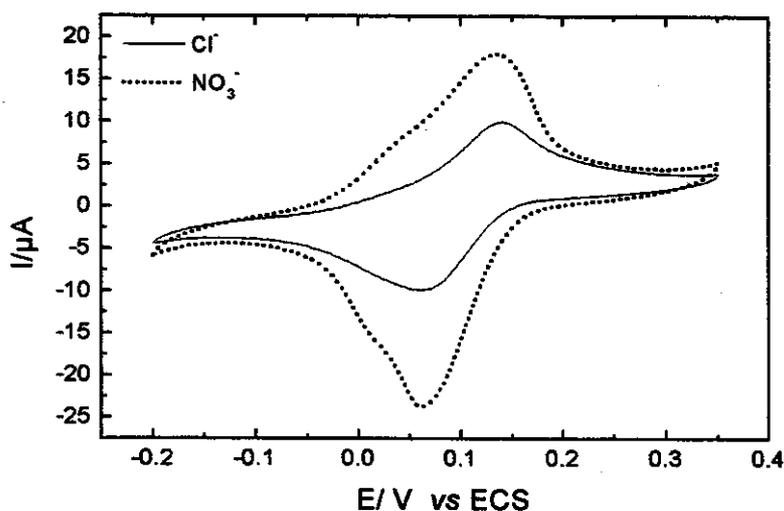


Figura III.2- Voltamogramas obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com FZAT. Solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Dentre os cátions estudados não se observou diferença de comportamento, Tabela III.3, com exceção do sódio com o qual obteve-se o valor menos positivos do E_m . Isto provavelmente, devido a baixa mobilidade do íon, resultado do seu raio de hidratação o que ocasionou uma fraca interação com o eletrodo, não permitindo um deslocamento de potencial tão pronunciado quanto os outros cátions.

Tabela III.3- Potenciais médios e ΔE obtidos com os diferentes íons estudados para o eletrodo contendo FZAT, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

íons	E_m (mV)	ΔE (mV)	íons	E_m (mV)	ΔE (mV)
Cl^-	130	53	K^+	130	53
NO_3^-	99	74	NH_4^+	138	79
ClO_4^-	116	109	Na^+	114	65
SO_4^{2-}	126	75	Ca^{2+}	134	62

A reversibilidade do eletrodo pode ser verificada através da separação de picos, ΔE , diferença entre potencial de pico anódico e catódico, e da razão entre corrente anódica e catódica (I_{pa}/I_{pc}). Os valores de ΔE , tanto para ânions quanto para cátions, aumentam em função da velocidade de varredura, indicando que o processo redox fica prejudicado, provavelmente porque o balanceamento de cargas fica dificultado, devido a um menor tempo que o sistema tem para se rearranjar com o aumento da velocidade.

A razão I_{pa}/I_{pc} diminui com o aumento da velocidade (1,0 à 0,7), para todos os íons estudados, este fato pode ser atribuído ao alargamento do pico de corrente que provoca uma diminuição da corrente total do sistema.

A Figura III.3 mostra o gráfico de corrente de pico anódico vs velocidade de varredura, observa-se que não há uma relação linear entre I_{pa} e v , comportamento similar ao observado para processos controlados por difusão. Neste caso, este comportamento foi atribuído a difusão dos íons da solução, uma vez que a espécie eletroativa está fortemente adsorvida na superfície da matriz, como revelou o estudo de estabilidade do eletrodo (comentado adiante).

III.B.1.2- Estudo com eletrodo contendo FZAM:

De maneira análoga ao observado com o FZAT, o FZAM também não mostrou resposta em solução de acetato e os voltamogramas apresentaram picos alargados nos voltamogramas, impedindo a leitura de corrente a velocidades superiores a 50 mV s^{-1} . Com este eletrodo também notou-se que o íon sulfato

estabiliza a forma reduzida do mediador deslocando o potencial para valores mais positivos; os outros ânions estudados apresentaram praticamente o mesmo comportamento. Já os cátions não mostraram diferença de E_m obtido, sugerindo que os mesmos interagem de forma semelhante com o eletrodo, Tabela III.4.

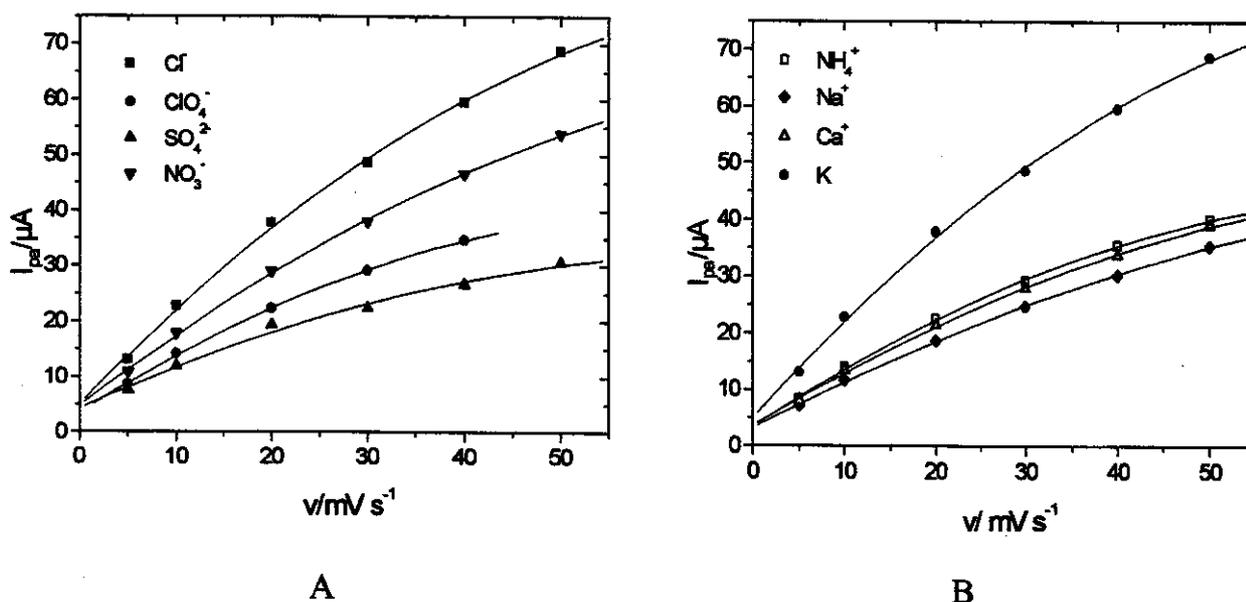


Figura III.3- Gráfico de corrente de pico anódico vs velocidade de varredura, eletrodo modificado com FZAT, A) ânions, B) cátions.

Tabela III.4-Potenciais médios e ΔE obtidos com os diferentes íons estudados para o eletrodo contendo FZAM, $v= 10 mV s^{-1}$.

íons	E_m (mV)	ΔE (mV)	íons	E_m (mV)	ΔE (mV)
Cl^-	126	51	K^+	126	51
NO_3^-	125	70	NH_4^+	130	91
ClO_4^-	122	70	Na^+	126	85
SO_4^{2-}	139	98	Ca^{2+}	121	90

Os estudos de caracterização realizados com FZAM revelaram um aumento de separação de picos (ΔE) com o aumento da velocidade de varredura, comportamento semelhante ao obtido com o FZAT, mostrando que o processo redox é dificultado com o aumento da velocidade. Todos os eletrólitos suporte estudados

mostraram a razão de corrente (I_{pa}/I_{pc}) próximo de 1 (0,8 à 1,0), revelando uma boa reversibilidade dos eletrodos. Esse valor também diminui com o aumento de velocidade, confirmando a dependência da resposta do eletrodo em função da difusão dos íons do eletrólito suporte.

Este comportamento difusional dos íons é comprovado pelo gráfico de i vs v , Figura III.4, o qual não apresenta uma relação linear, uma vez que a espécie está bem adsorvida na superfície da matriz, este comportamento refere-se aos íons em solução.

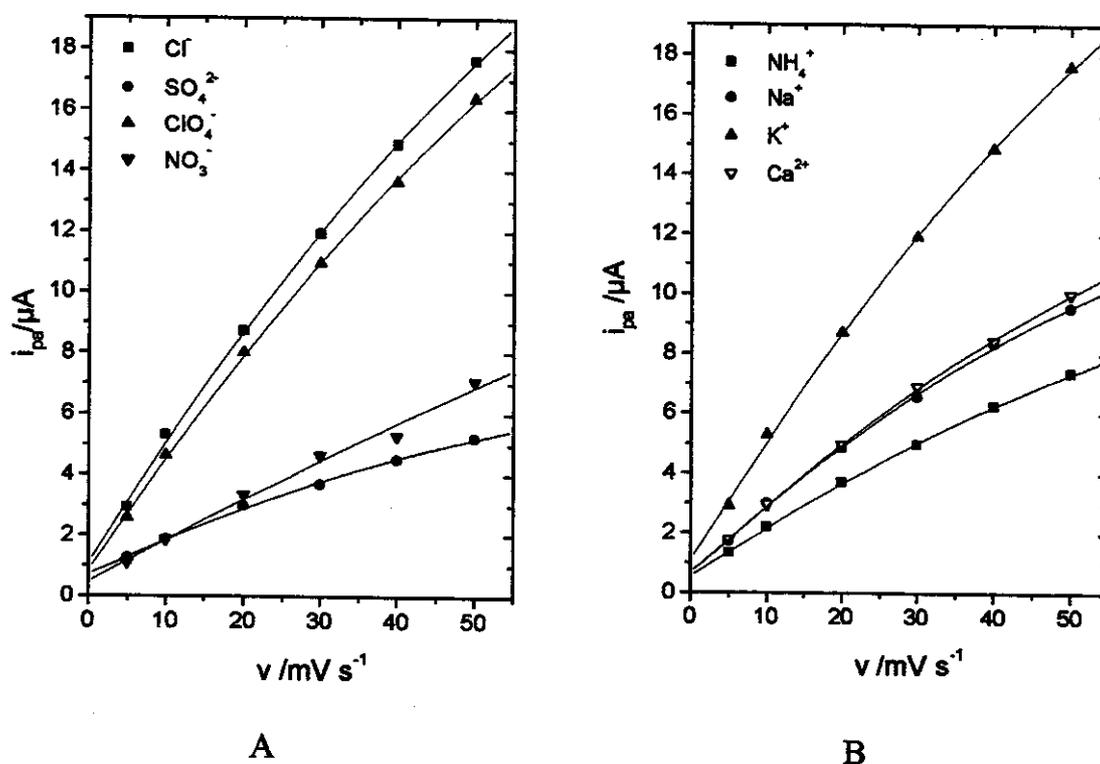


Figura III.4- Gráfico de corrente de pico vs velocidade de varredura, eletrodo modificado com FZAM, A) ânions, B) cátions.

III.B.1.3- Estudo com eletrodo contendo STAT:

Os estudos com a matriz ST foram realizados em pH 4,0, pois observou-se uma melhor definição dos voltamogramas nesse pH do que em valores mais altos.

Ao contrário do verificado para o FZ, em solução de acetato observou-se uma resposta bem definida com essa matriz, sugerindo que esse íon não deve possuir uma boa interação com o FZ, impossibilitando a resposta do eletrodo.

Os estudos com os ânions realizados para STAT mostraram que o íon perclorato estabiliza a forma oxidada do mediador deslocando o E_m para valores mais negativos, sendo que nas velocidades de varredura mais altas foi impossível determinar as correntes de pico. O acetato interage com o sistema de forma a retirar densidade de elétrons deslocando o potencial para valores menos negativos. Dentre os cátions, as soluções contendo potássio e amônio mostraram estabilizar a forma reduzida do mediador, deslocando o potencial para valores mais positivos, Tabela III.5.

Tabela III.5-Potenciais médios e ΔE obtidos com os diferentes íons estudados para o eletrodo contendo STAT, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

íons	E_m (mV)	ΔE (mV)	íons	E_m (mV)	ΔE (mV)
Cl ⁻	-114	107	K ⁺	-114	107
NO ₃ ⁻	-126	100	NH ₄ ⁺	-114	94
ClO ₄ ⁻	-142	87	Na ⁺	-127	94
Ac ⁻	-109	71	Ca ²⁺	-132	89
SO ₄ ²⁻	-113	104			

Os valores de ΔE obtidos com a STAT mostraram-se independente da velocidade de varredura, ao contrário do observado para a matriz FZ, sugerindo que a difusão desses íons para o balanceamento de cargas na superfície do eletrodo não é afetada pela velocidade de varredura. A razão entre as correntes também ficou inalterada com a velocidade de varredura, os valores obtidos foram perto de 1 (1,0 à 0,8), mostrando uma boa reversibilidade do eletrodo.

De maneira semelhante ao observado para a matriz FZ, este eletrodo não possui uma relação linear entre corrente e velocidade de varredura, da mesma maneira do explicado anteriormente, esse comportamento semelhante ao difusional

observado foi atribuído aos íons em solução, visto que o eletrodo apresentou grande estabilidade frente a ciclagem consecutiva.

III.B.1.4- Estudo com eletrodo contendo STAM:

Ao contrário do obtido anteriormente com o STAT, quando utilizou-se STAM não se observou resposta definida com os eletrólitos perclorato, sulfato e nitrato, sendo que nos dois primeiros casos foi impossível a obtenção de qualquer dado. Já em acetato observou-se uma resposta bem definida, e esse íon mostrou estabilizar a forma reduzida do mediador, deslocando o E_m para valores mais positivos. Os cátions, analogamente ao observado anteriormente, não mostraram diferença de comportamento, Tabela III.6.

Tabela III.6- Potenciais médios e ΔE obtidos com os diferentes íons estudados para o eletrodo contendo STAM, $v= 10 \text{ mV s}^{-1}$.

íons	E_m (mV)	ΔE (mV)	íons	E_m (mV)	ΔE (mV)
Cl^-	-124	101	K^+	-117	101
NO_3^-	-102	109	NH_4^+	-115	103
ClO_4^-	-	-	Na^+	-124	101
Ac^-	-98	76	Ca^{2+}	-121	112
SO_4^{2-}	-	-			

O eletrodo STAM não mostrou aumento de ΔE em função da velocidade de varredura, sugerindo que o processo redox é rápido. A STAM ao contrário do observado para o STAT, apresentou a razão I_{pa}/I_{pc} menor do que 1 (0,6-0,4) mostrando uma baixa reversibilidade do sistema.

Da mesma maneira que o observado para todos os eletrodos anteriormente caracterizados, a STAM também mostrou um comportamento semelhante ao difusional.

III.B.2-Efeito do pH do eletrólito suporte:

Os mediadores estudados apresentam processo redox envolvendo dois elétrons e dois prótons **Figura III.5**, assim a concentração hidrogeniônica do eletrólito suporte pode afetar o potencial de resposta. Quando em solução o potencial do corante pode ser calculado através da seguinte equação ⁹⁰:

$$E_f = E_0' + (RT/nF) \ln ([H^+]^3 + K_{r1}[H^+]^2 + K_{r1} K_{r2}[H^+]) \quad \text{na qual:}$$

E_f = potencial formal

E_0' = potencial pH=0 $E_0' = 0,534$ V (AT)
 $E_0' = 0,532$ V (AM)

R = constante dos gases

T = temperatura

n = número de elétrons (n=2)

F = constante de Faraday

K_{r1} = constante $pK_{r1} = 4,81$ (AT)

$pK_{r1} = 4,52$ (AM)

K_{r2} = constante $pK_{r2} = 5,41$ (AT)

$pK_{r2} = 5,85$ (AM)

$[H^+]$ = concentração hidrogeniônica

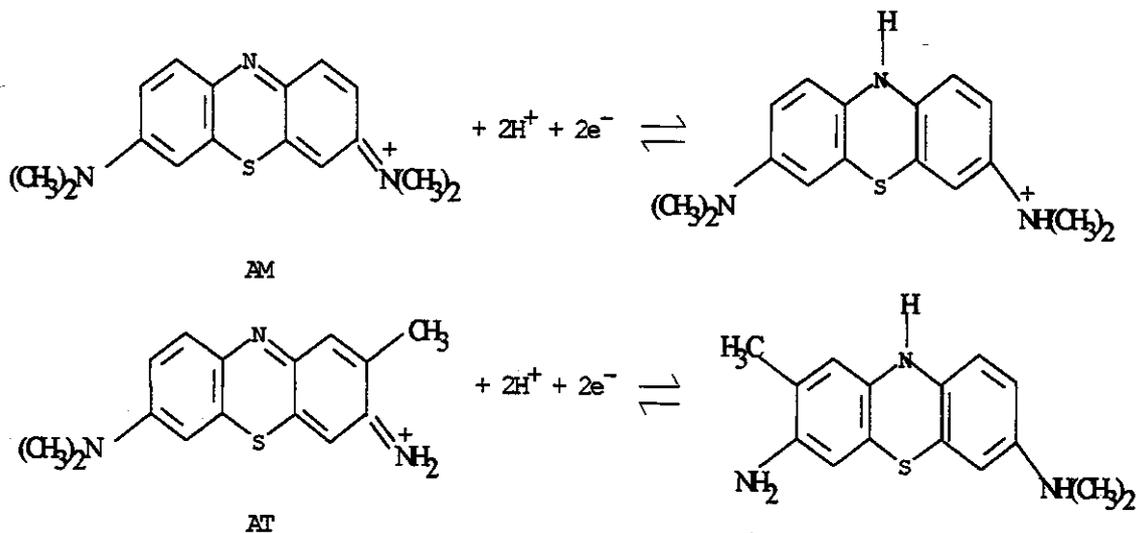


Figura III.5- Processo redox do mediador azul de metileno e azul de toluidina.

O potencial médio do corante adsorvido sobre a FZ manteve-se independente do pH do meio, sugerindo que a esta matriz exerce um efeito protetor sobre o mediador, **Figura III.6**. Já para a matriz ST em soluções com valores de pH abaixo

de 4,0 o potencial médio começa a ser deslocado para valores mais positivos, indicando que esta não possui um efeito tão protetor quanto a primeira.

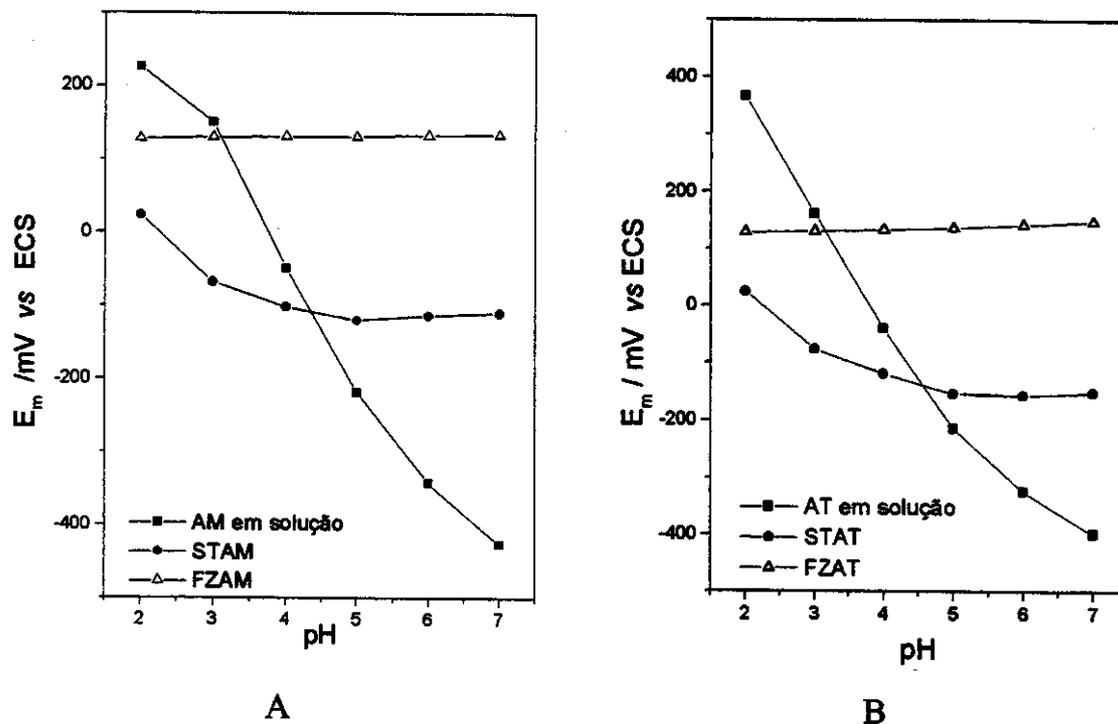


Figura III.6- Variação do potencial médio em função do pH da solução KCl 0,5 mol L⁻¹, $v=10 \text{ mV s}^{-1}$. A) AM, B) AT.

III.B.3-Estabilidade dos transdutores:

A estabilidade dos eletrodos construídos foi verificada através da ciclagem sucessiva e da monitoração da corrente. Não houve queda de corrente em nenhum caso, sugerindo que os mediadores estão fortemente adsorvidos na superfície da matriz, Figura III.7, em alguns casos observou-se um aumento de corrente devido a um melhor condicionamento do eletrodo. Essa boa estabilidade do eletrodo é uma característica é muito importante para a aplicação dos mesmos na construção de biossensores.

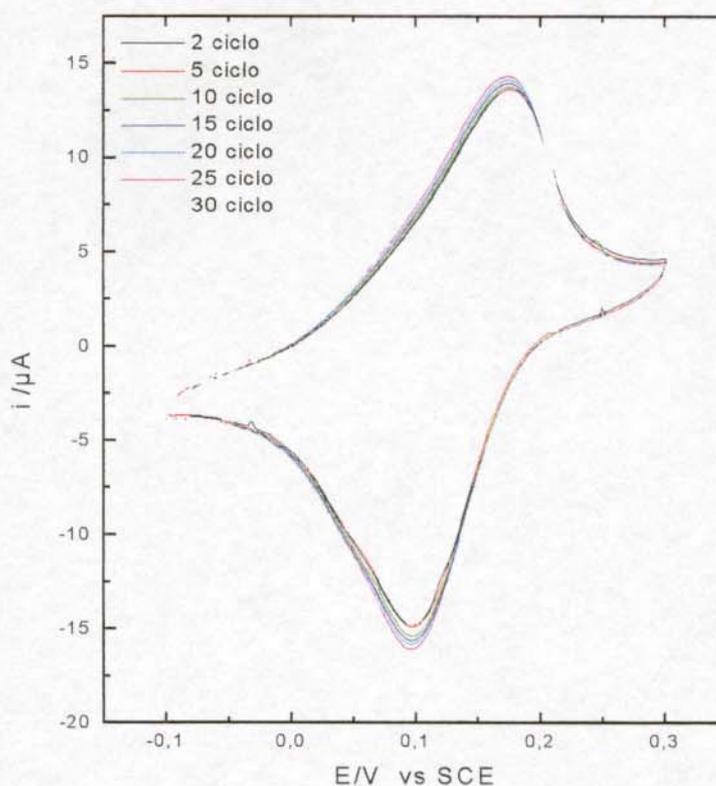


Figura III.7- Estabilidade do eletrodo de pasta de carbono modificada com FZAT, $v=10 \text{ mV s}^{-1}$, KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7.

III.B.4-Concentração do eletrólito suporte:

No estudo do efeito da variação da concentração do eletrólito suporte na resposta do eletrodo observou-se um aumento da corrente em função do aumento da concentração da solução de KCl para a matriz FZ, para ambos mediadores, indicando que quanto mais cargas existirem no sistema, melhor o balanceamento de cargas e, conseqüentemente, melhor resposta do eletrodo, **Figura III.8A**.

No estudo com a ST utilizou-se o acetato de sódio, uma vez que nesta solução o eletrodo apresentou melhor resposta, tanto com AT quanto com AM. Notou-se, porém, que ocorre um aumento de corrente quando a concentração varia de $0,1$ à $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, mas uma diminuição à $0,75 \text{ mol L}^{-1}$, **Figura III.8B**, sugerindo que uma alta

concentração desse eletrólito prejudica o processo redox do mediador, provavelmente referente a um envenenamento na superfície do eletrodo.

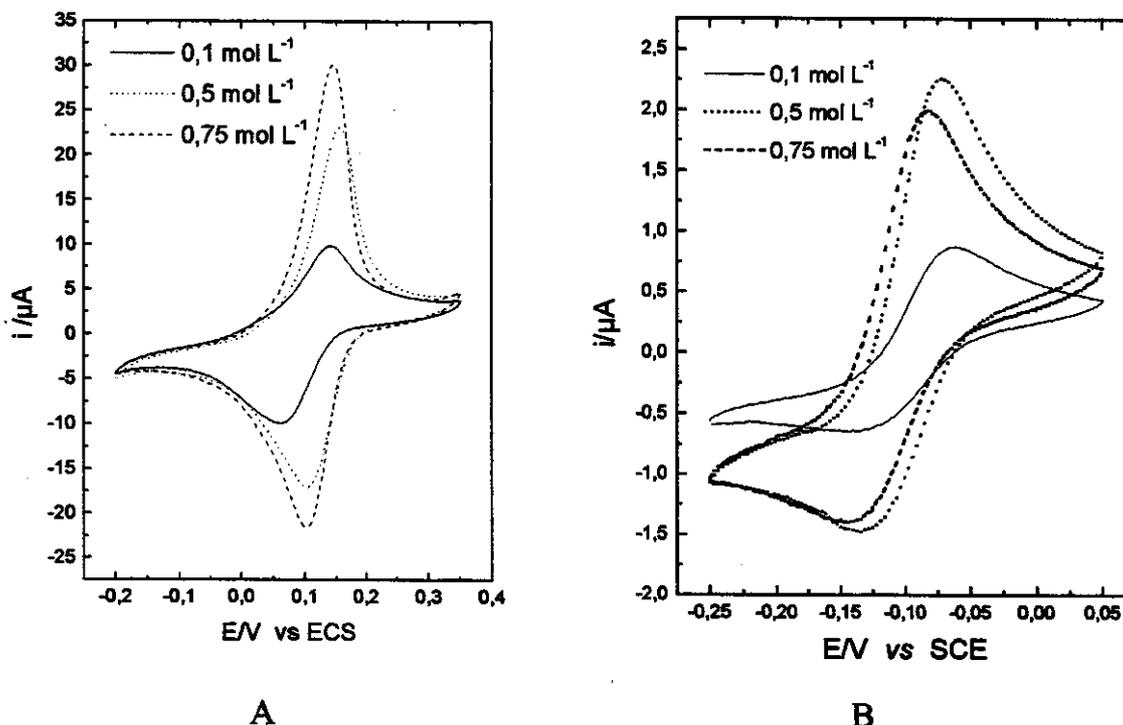


Figura III.8- Resposta do eletrodo de pasta de carbono modificada, A) FZAT em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7, A) STAT em $\text{NaAc } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

III.C-Construção do biossensor:

III.C.1- Escolha do transdutor para a construção do biossensor:

A enzima oxalato oxidase (OXO) tem como substratos no seu ciclo catalítico o oxalato e o oxigênio, sendo este último o responsável pela regeneração da enzima, dessa forma a construção do biossensor pode ser idealizada por dois caminhos:

1) em meio desoxigenado: mecanismo semelhante aos biossensores amperométricos de 2ª geração (Figura III.9A), com regeneração da enzima OXO pelo mediador;

2) em meio oxigenado: mecanismo semelhante aos biossensores de 2ª geração (Figura III.9B), mas o sinal gerado é função da detecção dos produtos pelo mediador;

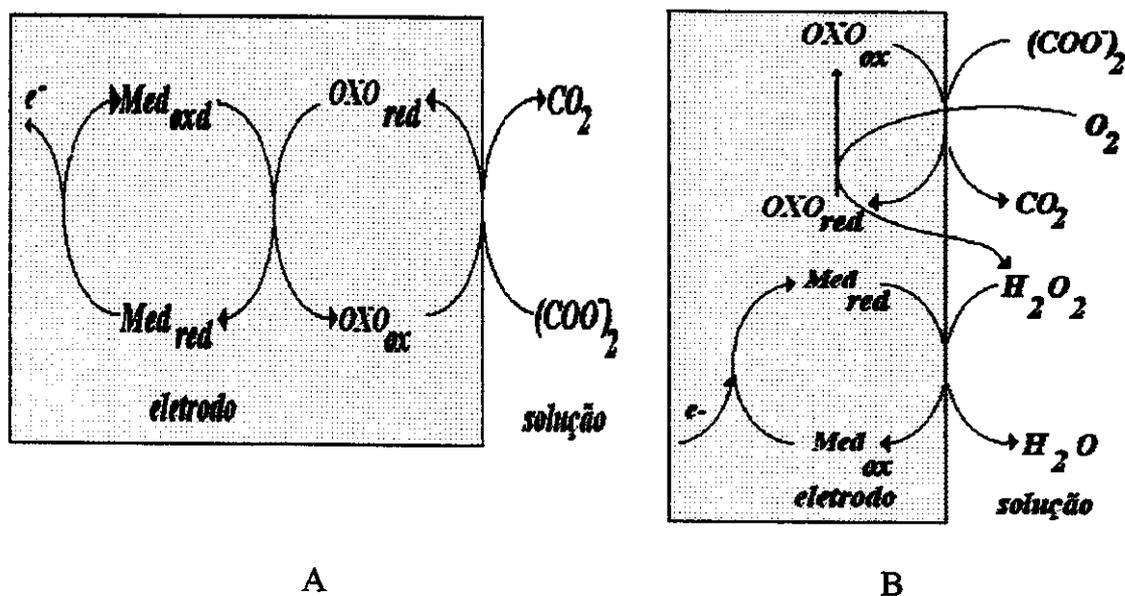


Figura III.9- Mecanismos de detecção do biossensor. A) desoxigenado, B) oxigenado.

Na escolha do transdutor (FZAT, FZAM, STAT, STAM) para a construção do biossensor avaliou-se a potencialidade dos mesmos para detecção de peróxido, visto que nos estudos preliminares com o biossensor em meio desoxigenado, revelaram que o primeiro mecanismo proposto não poderia ser aplicado, pois não se obteve nenhuma resposta. Este fato sugeriu que o oxigênio atua como um segundo substrato, participando do processo enzimático, e não apenas como um regenerador da enzima. O transdutor contendo a matriz STAT foi o que apresentou melhor resposta para o H₂O₂, Figura III.10, e, por isso, foi escolhido para construção do biossensor. É interessante ressaltar que os transdutores contendo a matriz FZ não apresentaram resposta significativa com nenhum dos dois mediadores.

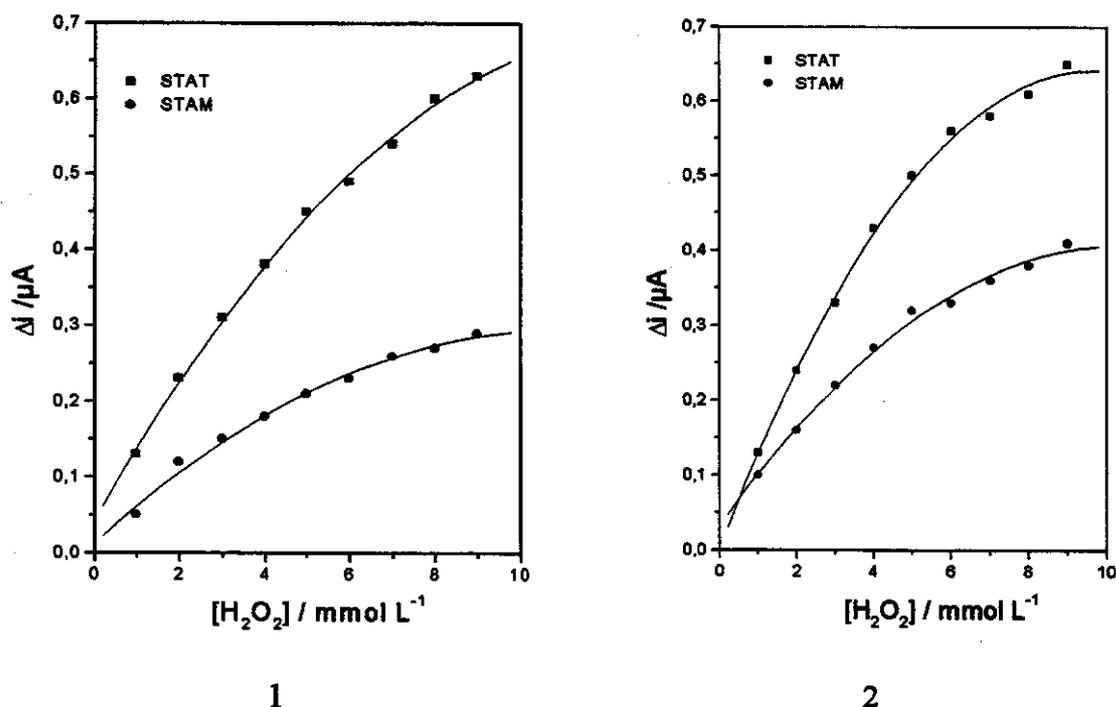


Figura III.10- Curvas analíticas para peróxido de hidrogênio obtida com eletrodo de pasta de carbono. 1) solução tampão succinato $0,1 \text{ mol L}^{-1} / 0,4 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ pH=3,8; 2) solução tampão citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1} / 0,4 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ pH 3,8. $v=10 \text{ mV s}^{-1}$.

III.C.2- Avaliação do biossensor para oxalato:

A OXO foi imobilizada no eletrodo na superfície do STAT através do processo de ligação cruzada com a utilização de um reagente bifuncional, o glutaraldeído (GA)⁴². O método de imobilização via ligação covalente com carbodiimida, não pôde ser utilizado, visto que esta liga-se aos grupos carboxílicos da enzima, os quais estão presentes no sítio ativo da enzima, conforme mostraram estudos recentes⁴⁷.

O sinal obtido com este biossensor apresentou muito ruído e respostas muito pequenas, mostrando que a quantidade de peróxido gerada no meio estava no limite de detecção do transdutor. A opção encontrada foi o acoplamento ao biossensor de uma segunda enzima, a Horseradish peroxidase, que apresenta grande afinidade pelo

peróxido de hidrogênio atuando como catalisador para a OXO e amplificando o sinal. Esse processo catalítico ocorre pelo consumo de peróxido pela HRP, promovendo um deslocamento do equilíbrio da reação enzimática da OXO, assim maior quantidade de oxalato é consumido e mais peróxido formado. A HRP, devido a sua alta afinidade por H_2O_2 , promove um efeito de pré-concentração amplificando o sinal do biossensor.

A enzima HRP foi imobilizada na superfície do grafite através de ligação covalente utilizando-se carbodiimida. Eletroquimicamente a HRP pode ser regenerada por transferência direta, na qual os elétrons são transferidos do eletrodo para a enzima (processo lento), ou por transferência mediada, na presença de um mediador^{84,85}. Dessa forma o mecanismo proposto para o biossensor está representado na **Figura III.11**. A presença do mediador melhora a transferência de elétrons permitindo um melhor sinal, como pode ser visto na **Figura III.12**, este fato pode ser explicado por uma maior condutividade da pasta, ou pela regeneração da enzima pelo mediador.

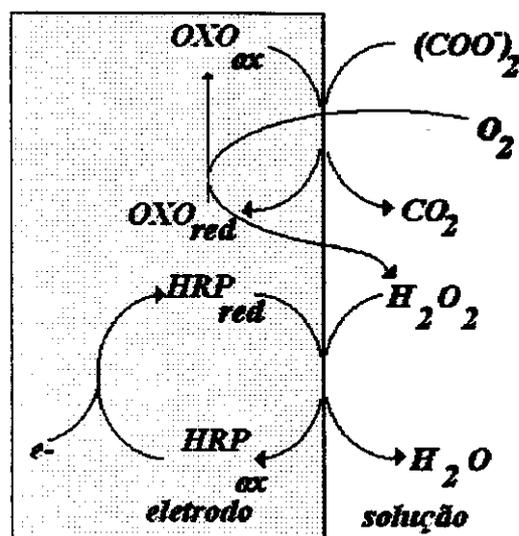


Figura III.11- Mecanismo de resposta proposto para o biossensor bienzimático para oxalato.

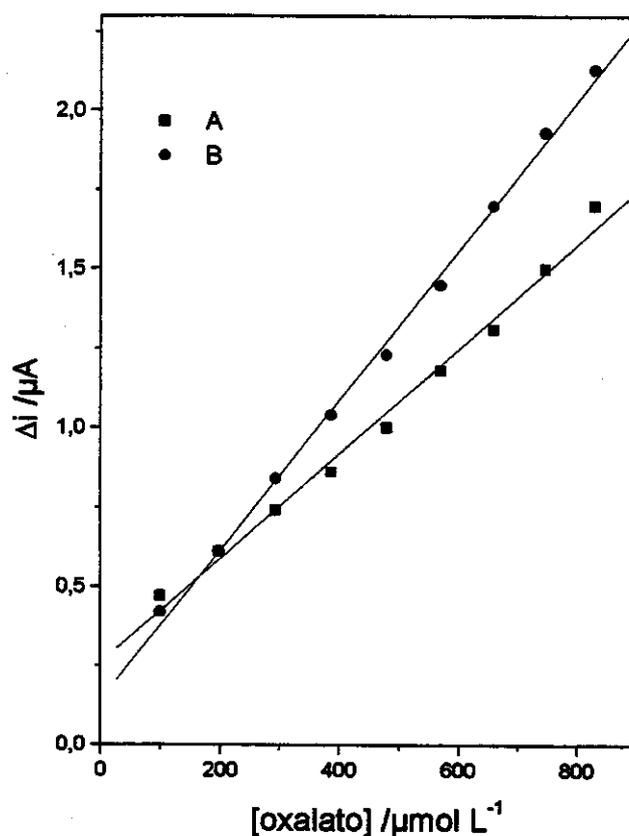


Figura III.12- Curva analítica obtida com o biossensor bienzimático OXO/HRP preparado com A) ST, B) STAT. $E_{\text{apl}} = -100 \text{ mV s}^{-1}$ vs SCE.

III.C.2.1- Influência do potencial aplicado:

O potencial aplicado tem uma grande influência na resposta do biossensor para o oxalato, como mostra a Figura III.13. A resposta aumenta quando o potencial aplicado é mais negativo e tende a um patamar em -150 mV . No entanto, esse potencial, além de permitir a interferência do oxigênio, é muito negativo e pode levar a formação de compostos de enzima HRP inativa, ocasionando a perda de atividade e resposta da mesma⁹². Dessa forma fixou-se o potencial em -100 mV para as medidas.

III.C.2.2- Efeito da solução tampão:

A literatura não é concordante quanto ao citrato ou succinato diminuírem a resposta da enzima OXO, dessa forma para a escolha do mesmo fez-se uma curva de calibração em cada sistema. As respostas obtidas com citrato foram menores do que com succinato, **Figura III.14**, mostrando que o mesmo influencia na atividade da enzima. Ressalta-se ainda, que todos os biossensores cuja a imobilização da OXO foi realizada com essa solução tampão não apresentaram resposta, o contrário do obtido com solução tampão succinato, este fato sugere que o mesmo é mesmo um inibidor da enzima.

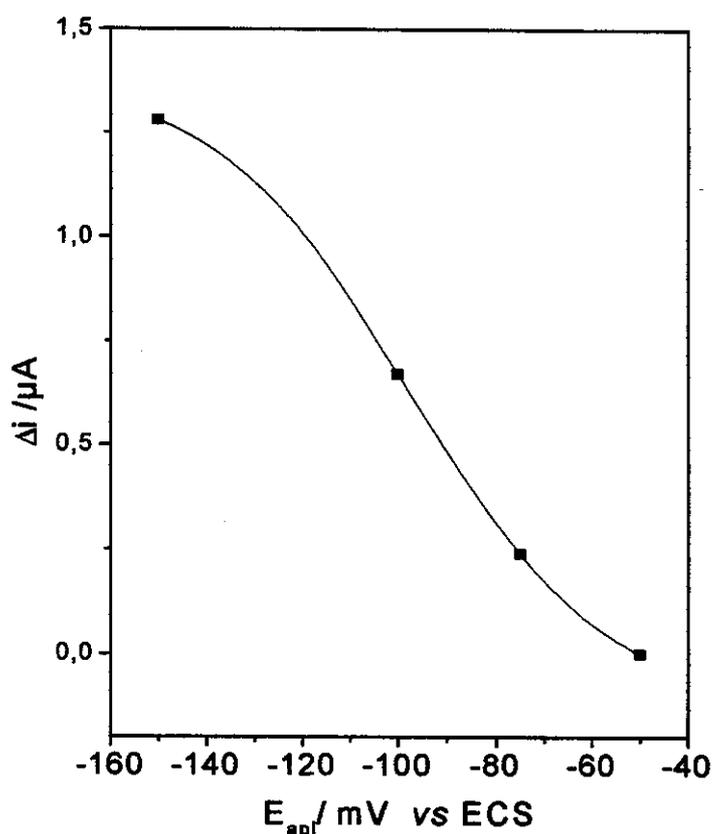


Figura III.13- Curva de potencial obtida para o biossensor bienzimático, em solução tampão succinato $0,1 \text{ mol L}^{-1}/0,4 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ pH 3,8, $[\text{oxalato}] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

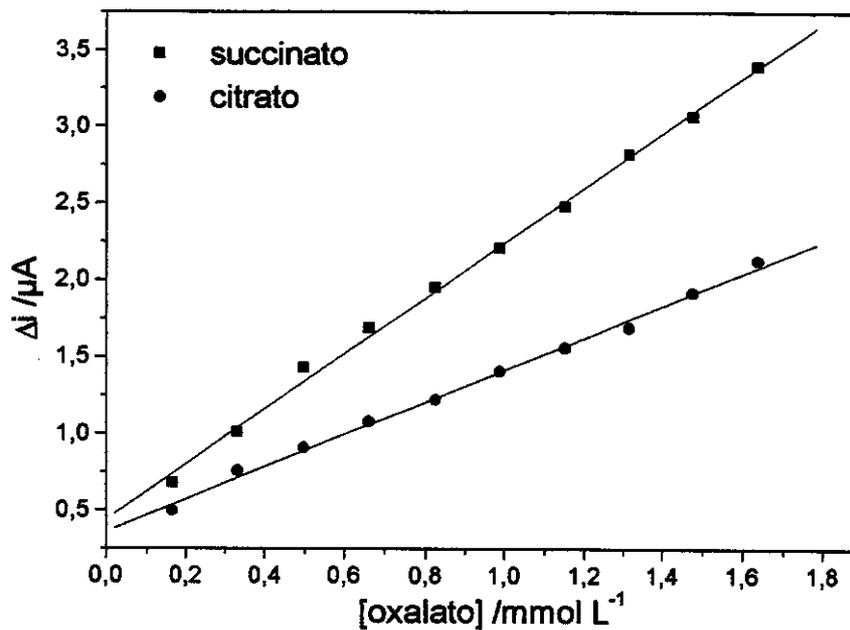


Figura III.14- Curvas analíticas obtidas com eletrodo bienzimático OXO/HRP, A) solução tampão succinato 0,1 mol L⁻¹/0,4 mol L⁻¹ KCl pH=3,8, B) solução tampão citrato 0,1 mol L⁻¹/ 0,4 mol L⁻¹ KCl pH 3,8. $E_{\text{apl}} = -100$ mV vs SCE.

III.C.2.3- Influência do pH na resposta do biossensor:

O biossensor foi avaliado em diferentes valores de pH, pois as enzimas apresentam respostas ótimas em determinados valores de pH (pH 3,8 para OXO e 6,8 HRP) e quando imobilizadas estes podem ser ligeiramente alterados.

O biossensor apresentou uma melhor resposta em pH 3,3, Tabela III.7. Os resultados mostraram que a resposta do biossensor diminuiu em pH 4,3 e 4,5. Este fato sugere que a cinética da enzima OXO é mais afetada pelo pH do que a da HRP. Assim escolheu-se o pH 3,8 para as medidas subsequentes, visto que o biossensor apresenta uma boa resposta e aumentando o tempo de vida, devido a maior estabilidade da enzima HRP.

Tabela III.7- Influência do pH da solução tampão succinato $0,1 \text{ mol L}^{-1}/0,4 \text{ mol L}^{-1}$ KCl na resposta do biossensor bienzimático, $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de oxalato, $E_{\text{apl}} = -100 \text{ mV vs SCE}$.

pH	I / μA
2,9	$0,95 \pm 0,06$
3,3	$1,04 \pm 0,04$
3,8	$0,84 \pm 0,06$
4,3	$0,75 \pm 0,07$
4,5	$0,68 \pm 0,06$

III.C.2.4- Curva analítica:

Determinada as condições dos experimentos traçou-se uma curva analítica, Figura III.15. Pode-se verificar que o eletrodo apresenta boa resposta de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ à 2 mmol L^{-1} de oxalato, cuja equação ajustada para esse intervalo com $n=20$ foi $i=0,33(\pm 0,04)+2,29(\pm 0,04)[\text{oxalato}]$, $r=0,9978$, sendo i em μA e $[\text{oxalato}]$ em mmol L^{-1} .

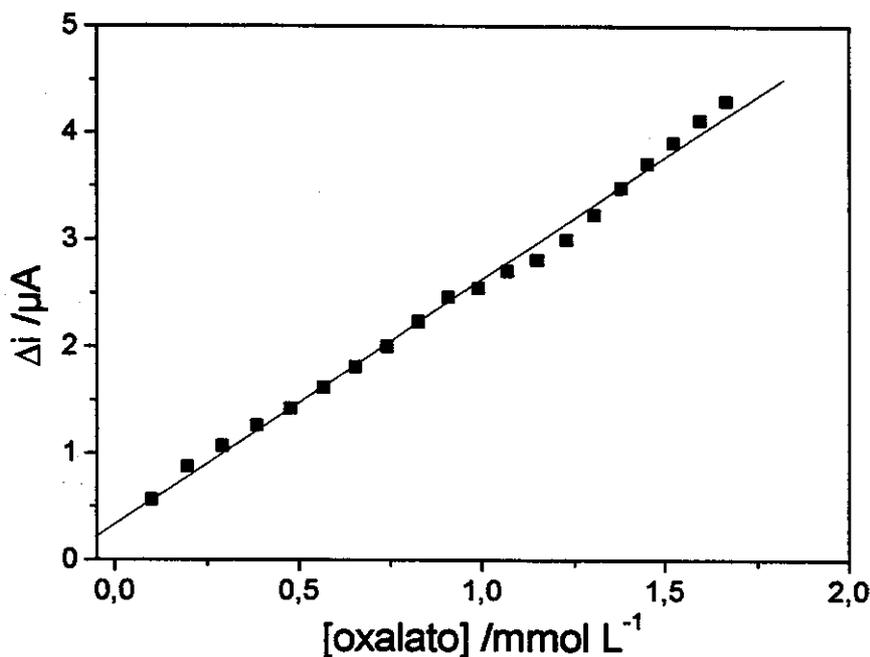


Figura III.15- Curva de calibração obtida com o biossensor bienzimático em solução tampão succinato $0,1 \text{ mol L}^{-1}/0,4 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,8, $E_{\text{apl}} = -100 \text{ mV vs SCE}$.

O tempo de resposta do biossensor foi determinado através dos cronoamperogramas, através do intervalo de tempo gasto entre o momento da injeção e o máximo da resposta, o qual foi de 0,5 s. A Figura III.16 mostra que a resposta do mesmo para oxalato é rápida, constituindo-se uma vantagem frente aos métodos colorimétricos, que envolvem o tempo de espera para o desenvolvimento de coloração.

O limite de detecção do biossensor considerado como 3 vezes o ruído foi $0,09 \text{ mmol L}^{-1}$ de oxalato. Nas análises obteve-se repetibilidade, em termos de desvio padrão, igual a $0,09 \mu\text{A}$. Um outro fator importante para os biossensores é a frequência analítica, levando-se em consideração o tempo necessário entre as medidas (tempo de agitação e aplicação de potencial) a frequência analítica foi de 36 amostras/h.

A resposta do biossensor foi diminuindo nos dias subsequentes à sua construção, permitindo realizar medidas por quatro dias, nesse período houve a perda de 54% do sinal, após esse período o biossensor apresenta muito ruído impossibilitando a leitura de qualquer sinal, Figura III.17. É interessante ressaltar que o biossensor estocado a seco não apresenta resposta no dia seguinte, por isso o mesmo foi acondicionado em solução tampão succinato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ / KCl $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,8.

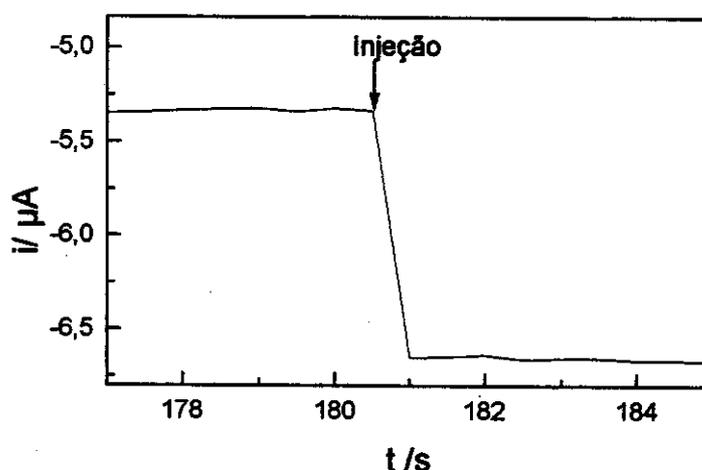


Figura III.16- Tempo de resposta do biossensor bienzimático.

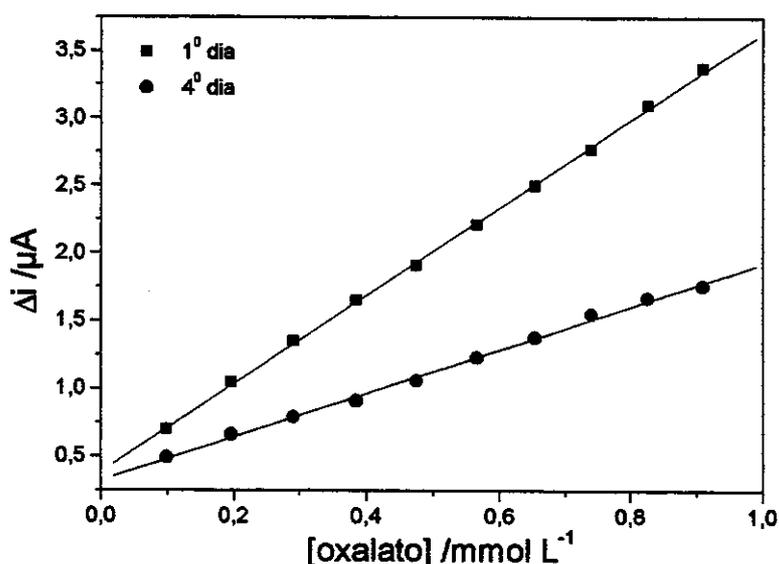


Figura III.17- Curvas analíticas do biossensor bi-enzimático para oxalato, obtidas em solução tampão succinato 0,1 mol L⁻¹/ KCl 0,4 mol L⁻¹ pH 3,8, E_{apl} = -100 mV.

III.C.2.5- Interferentes:

O citrato, como descrito, anteriormente, apresenta interferência na resposta do biossensor, além dele a literatura descreve o ácido ascórbico como um interferente em potencial. Essa interferência pode ser devido a dois fatores distintos:

- 1) conversão do ácido ascórbico à oxalato, aumentando a concentração original das amostras (falso positivo)⁴⁹;
- 2) consumo do peróxido gerado na reação enzimática, para degradação do ácido ascórbico à dehidroascorbato, diminuindo o sinal que seria gerado por essa espécie⁵⁸.

No caso biossensor desenvolvido neste trabalho, como o sistema de detecção é através do peróxido gerado, pode-se ver que a presença do ácido ascórbico diminui a resposta obtida, **Figura III.18**.

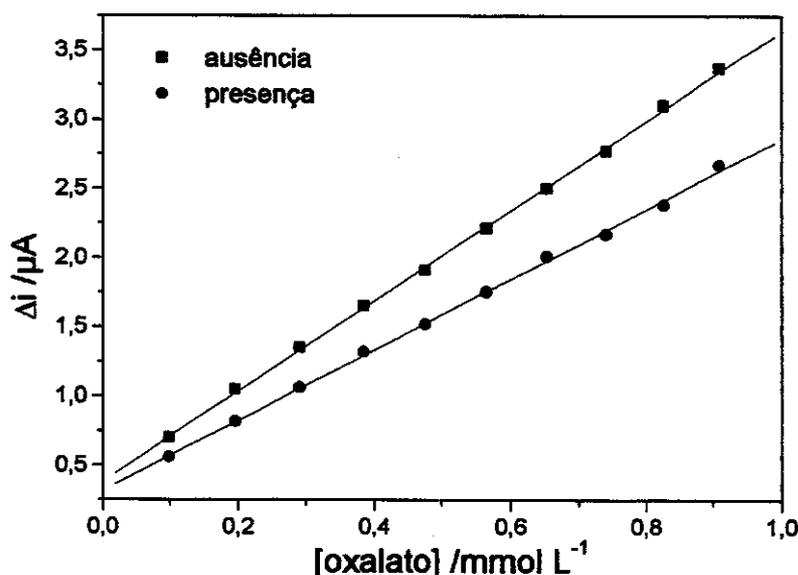


Figura III.18- Resposta do biossensor bienzimático para oxalato em solução tampão succinato 0,1 mol L⁻¹ / 0,4 mol L⁻¹ pH=3,8, $E_{apl.} = -100$ mV vs SCE A) ausência e B) presença de ácido ascórbico 1:1.

O ácido ascórbico pode ser eliminado por diferentes métodos descritos na literatura, um dos mais simples e de grande eficiência, utiliza carvão ativo e permite a recuperação de quase 100% de oxalato em amostras de urina⁵⁸.

III.C.2.6- Avaliação do biossensor com amostra real:

O biossensor foi avaliado em amostras de espinafre em comparação com o método da AOAC. Este método mostrou-se muito trabalhoso sendo necessárias várias etapas de precipitação de proteínas para que o extrato do vegetal ficasse límpido e o oxalato pudesse ser precipitado o mais puro possível. Essas precipitações visam também a retirada do ferro, visto este ser um elemento abundante no espinafre, o qual interferirá na titulação com $KMnO_4$.

Os valores encontrados com o biossensor foram sempre superiores ao fornecido pelo método padrão, Tabela III.8. Essa diferença pode ser atribuída a perdas ocorridas nas diversas etapas para a precipitação do ácido oxálico, como

explicado acima, o que não ocorre com o biossensor. Além disso, neste método desenvolvido não há a etapa de titulação permanganométrica, a qual exige muitos cuidados como a temperatura da solução e o ponto de viragem de difícil detecção devido ao volume da solução.

O método com biossensor mostrou-se muito mais prático, evitando a execução da etapa com tungstênio, permitindo que a análise seja mais rápida e gere menos resíduo. Um outro aspecto importante é que o método de referência necessita de 4 dias para fornecer o resultado, enquanto o biossensor apenas 1.

Tabela III.8- Comparação do teor de oxalato obtido com biossensor e método padrão, n=2.

Amostra	Método AOAC*	biossensor*	diferença (%)
1-extrato I	704 (± 12)	798 (± 42)	13
2-extrato I	582 (± 23)	622 (± 60)	7

* (mg de oxalato/ 100g de espinafre)

IV-Conclusões

A matriz fosfato de zircônio mostrou uma grande afinidade pelos dois mediadores estudados (azul de toluidina e azul de metileno), conferindo ao eletrodo uma grande estabilidade. Um comportamento do tipo difusional foi observado com os eletrólitos estudados, mostrando a dependência da mobilidade dos íons até a superfície do eletrodo para o balanceamento de cargas.

A sílica titânio também apresentou uma boa interação com os mediadores conferindo boa estabilidade ao eletrodo. Ao contrário do observado para o fosfato de zircônio, a adsorção dos mediadores necessitou de uma concentração maior das soluções de adsorção, sugerindo uma maior dificuldade na imobilização dos mediadores.

A acidez do suporte permitiu que o potencial médio dos mediadores deslocasse para valores mais positivos do observado quando em solução. Esse efeito é mais pronunciado para o fosfato de zircônio do que para a sílica titânio, revelando um caráter mais ácido para a primeira matriz.

O estudo da influência da acidez do eletrólito mostrou que a matriz sílica titânio mantém o potencial médio constante até cerca de pH 4, abaixo do qual ocorre o deslocamento do potencial para valores mais positivos, já o fosfato de zircônio mantém praticamente constante até pH~2, este fato vem a confirmar que a matriz fosfato de zircônio é mais ácida que a sílica titânio.

Dentre os mediadores estudados observou-se que o azul de toluidina apresenta melhor resposta em ambas as matrizes, obtendo-se voltamogramas melhores definidos dos que os observados para o azul de metileno.

O trabalho mostrou que dentre os eletrodos estudados, apenas a matriz sílica titânio apresentou eficiência na catálise do peróxido, sendo o azul de toluidina o mediador que revelou melhor resposta, sendo, portanto, o escolhido para o desenvolvimento do biossensor.

A enzima oxalato oxidase não apresenta atividade enzimática em meio desoxigenado, sugerindo que o oxigênio participa efetivamente do processo catalítico. Dessa forma a resposta do biossensor foi avaliada frente ao peróxido

gerado pela enzima. Neste método de detecção a quantidade de peróxido gerada estava abaixo do limite de detecção do eletrodo, por isso foi necessário a co-imobilização da enzima Hoseradish peroxidase.

O biossensor assim constituído originou um sistema bienzimático, cujo sinal eletroquímico gerado é referente a regeneração da enzima HRP que é proporcional a concentração de oxalato na solução.

O biossensor apresentou maior resposta a pH 3,3, porém este poderia afetar o tempo de vida do mesmo, sendo por isso utilizado o pH ótimo da própria enzima oxalato oxidase para as análises subsequentes.

Quando aplicado potencial de -150 mV, o biossensor apresenta melhor resposta. No entanto, ele não pode ser utilizado, pois diminui o tempo de vida da enzima peroxidase, dessa forma utilizou-se um potencial de -100 mV.

Apesar do biossensor apresentar um tempo de vida de 4 dias, vantagens como: a facilidade de preparação, faixa linear de 0,1 a 2 mmol L⁻¹, limite de detecção de 0,09 mol L⁻¹, tempo de resposta baixo sendo a resposta máxima alcançada em 0,5 s, frequência analítica de 36 amostras/h, permitem sugerir que o biossensor desenvolvido seja uma alternativa ao método oficial.

A utilização de solução tampão citrato forneceu uma resposta inferior sugerindo que esse composto deve inibir a enzima, este fato vem confirmar a ausência de resposta quando a enzima OXO foi imobilizada com o mesmo. Outro interferente da enzima foi o ácido ascórbico que também diminuiu a resposta do biossensor, quando adicionado concomitantemente com o oxalato.

O biossensor foi avaliado em análises de amostras de espinafre. Nesta obteve-se uma diferença sistemática de 7 e 13% superior ao método referência. Este fato pode estar relacionado a perdas durante as várias etapas de precipitação do método da AOAC. Apesar disso apresenta várias vantagens, visto que o tempo para a análise é reduzido em 3 dias e são gerados menos resíduos.

V-PROPOSTAS

FUTURAS

Propostas Futuras

- ❖ Aplicação do biossensor em amostras de urina.

- ❖ Aumentar estabilidade do biossensor pela co-imobilização de aditivos como albumina de soro bovino, DNA, polietilenoimina.

- ❖ Estudo de métodos de eliminação do ácido ascórbico nas determinações de oxalato.

VI-REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

1. Moses, P. R.; Wier, P.; Murray, R. W.; *Anal. Chem.*; 47, 1975, 1882.
2. Souza, M. F. B.; *Química Nova*; 2, 1997, 191.
3. Kalcher, K.; Kauffmann, J. M.; Wang, J.; Svancara, I.; Vytras, K.; Neuhold, C.; Yang, Z.; *Electroanalysis* ; 7, 1995, 5.
4. Mafatle, T. J.; Nyokong, T.; *J. Electroanal. Chem.*; 408, 1996, 213.
5. Perez, E. F.; Oliveira Neto, G.; Tanaka, A.A.; Kubota, L. T.; *Electroanalysis*; 10, 1998, 111.
6. Ivaska, A.(ed.); Sara,R.; "*Contemporary Electroanalytical Chemistry*", Plenum Press, New York, 1990.
7. Labuda, J.; Hudáková, M.; *Electroanalysis*; 9, 1997, 239.
8. Lobo, M. J.; Miranda, A. J.; Lopez-Fonseca, J. M.; Tuñon, P.; *Anal. Chim. Acta*; 325, 1996, 33.
9. Gorton, L.; *Electroanalysis*; 7, 1995, 23.
10. Perez, E. F.; Kubota, L. T.; Tanaka, A. A.; Oliveira Neto, G.; *Electrochim. Acta*; 43, 1998, 1665.
11. Kubota, L. T.; Gouvea, F.; Andrade, A. N.; Milagres, B. G.; Oliveira Neto, G.; *Electrochim. Acta*; 41, 1996, 1465.
12. Walcarius, A.; *Electroanalysis*; 8, 1996, 971.
13. Pessôa, C. A.; Gushikem, Y.; Kubota, L. T.; Gorton, L.; *J. Electroanal. Chem.*; 431, 1997, 23.
14. Kubota, L. T.; Gorton, L.; *Electroanalysis*; 11, 719, 1999.
15. Huhey, J. E.; "*Inorganic Chemistry*"; Harper Collins Publishers; New York; 1983; p 682.
16. Fujiwara, S.T.; Gushikem, Y.; *J. Braz. Chem. Soc.*; 10, 1999, 389.
17. Peixoto, C. R. M., Dissertação de Mestrado, "Síntese, caracterização e aplicações analíticas do óxido de zircônio (IV) altamente disperso sobre a superfície de sílica gel"; Unicamp, 1992.
18. Peixoto, C. R. M.; Kubota, L. T.; Gushikem, Y.; *Anal. Procce. Incl. Anal. Comm.*; 32, 1995, 503.

19. Rodrigues, U.P.; Gushikem, Y.; Fujiwara, F. Y.; Standler, E.; Drago, V.; *Struct. Chem.*; 5, 1994, 129.
20. Rodrigues Filho, U. P.; Dissertação de Mestrado, "Síntese e caracterização de complexos pentacianoferratos (II) na superfície de sílica gel organomodificada"; Unicamp, 1992.
21. Nagata, N.; Kubota, L. T.; Bueno, M. I. M. S.; Zamora, P. G. P.; *J. Colloid Interface Sci.*; 200, 1998, 121.
22. Malinauskas, A; Ruzgas, T; Gorton, L; Kubota, LT; *Electroanalysis*; 12, 2000, 194.
23. Ruan, C.; Yang, F.; Xu, J.; Lei, C.; Deng, J.; *Electroanalysis*; 9, 1997, 1180.
24. Clearfield, A.(ed.); *"Inorganic Ion Exchange Materials"*, CRC Press Inc., Florida, 1982.
25. Hoppe, R.; Alberti, G.; Constantino, U.; Dionigi, C.; Schulz-Ekloff, G.; Vivani, R.; *Langmuir*; 13, 1997, 7252.
26. Wang, B.; Dong, S.; *Talanta*; 51, 2000, 565.
27. Katakis, I.; Dominguez, E.; *Mikrochim. Acta*; 126, 1997, 11.
28. Willner, I.; Katz, E.; Willner, B.; *Electroanalysis*; 9, 1997, 965.
29. Laurinavicius, V.; Kurtinaitiene, B.; Liausksminas, V.; Ramanavivius, A.; Meskys, R.; Rudomanskis, R.; Skotheis, T.; Bouslavsky, L.; *Anal. Lett.*; 32, 1999, 299.
30. Pessôa, C. A.; Gushikem, Y.; Kubota, L. T.; *Electroanalysis*; 9, 1997, 800.
31. Danjo, M.; Tshaku, M.; Nakayama, H.; Eguchi, T.; Nakamura, N.; Yamaguchi, S.; Nariai, H.; Motooka, I.; *Bull. Chem. Soc. Japan*; 70, 1997, 1053.
32. Garcia, C. A. B.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T.; *Anal. Chim. Acta*; 374, 1998, 201.
33. Guerra, S. V.; Kubota, L. T.; Xavier, C. R.; Nakagaki, S.; *Anal Sci.*; 15, 1999, 1231.
34. Ciszewski, A.; Milczarek, K.G.; Kubaszewski, E.; Lozunski, M.; *Electroanalysis*; 10, 1998, 628.

35. Turner, A. P. F. (ed); Karube, I.; Wilson, G. S.; in "*Biosensors: fundamentals and applications*", Oxford; 1989, 1ª edição.
36. Collings, A. F.; Caruso, F.; *Rep. Prog. Phys.*; 60, 1997, 1397.
37. Alegret, S.; *Analyst*; 121, 1996, 1751.
38. Bicketstaff, G.; "*Immobilization of Enzymes and Cells Methods in Biotechnology*"; Human Press; New Jersey; 1997.
39. Updike, S. J.; Hicks, G. P.; *Nature*; 214, 1967, 986.
40. Gorton, L.; Bremle, G.; Csöregi, E.; Jönsson-Petterson, G.; Persson, B.; *Anal. Chim. Acta.*; 249, 1991, 43.
41. Bartlett, P. N.; Tebbutt, P.; Whitaker, R. G.; *Progr. Reaction Kinetic*; 16, 1991, 55.
42. Walt, D. R.; Agayn, V.; *Trends Anal. Chem.*; 13, 1994, 425.
43. Kobos, R. K.; Ramsey, T. A.; *Anal. Chim. Acta*; 121, 1980, 111.
44. Peldszus, S.; Huck, P. M.; Andrews, S. A.; *J. Chromatogr. A*; 793, 1998, 198.
45. Azarashvili, T. S.; Evtodienko, V. Y.; Kudzina, L. Y.; *Russ. J. Plant Physiol.*; 43, 1996, 169.
46. Kotsira, V. P.; Clonis, Y. D.; *Arch. Biochem. Biophys.*; 340, 1997, 239.
47. Kotsira, V. P.; Clonis, Y. D.; *Arch. Biochem. Biophys.*; 356, 1998, 117.
48. Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Casajús, R.; *Analyst*; 120, 1995, 2111.
49. Wandzilak, T. R.; Dándre, S. P.; Davis, P. A.; Williams, H. E.; *J. Urol.*; 151, 1994, 834.
50. Bacan, B.; Andrade, J. C.; Godinho, O. E. S.; Barone, J. S.; "*Química Analítica Quantitativa Elementar*"; Edgard Blücher Ltda; 1979; p. 224.
51. Fernandes, J. R.; Oliveira Neto, G.; Tubino, M.; Kubota, L.T.; *Anal. Sci.*; 12, 1996, 443.
52. Reddy, S. M.; Higson, S. P. J.; Christie, I. M.; Vadgama, P. M.; *Analyst*; 119, 1994, 949.

53. Tietz, N. W., "Clinical Guide to Laboratory Tests", W B Saunders Company, Philadelphia, 2ª edição, 1990, p. 421.
54. Melmom, K. L.; "Clinical Pharmacology: Basis Principles in Therapeutics", McGraw-Hill; 3ª edição; 1992; p. 278.
55. Nelson, B. C.; Uden, P. C.; Rockwell, G. F.; Gorski, K. M.; Aguilera, Z. B.; *J. Chromatogr. A*; 771, 1997, 285.
56. Leon, L. E.; Ríos, A.; Castro, M. D. L.; Valcárcel, M.; *Anal. Chim. Acta*; 234, 1990, 227.
57. Salinas, F.; Martínez-Vidal, J. L.; González-Murcia, V.; *Analyst*; 114, 1989, 1685.
58. Inamdar, K. V.; Raghavan, K. G.; Pradhan, D. S.; *Clin. Chem.*; 37, 1991, 864.
59. Infantes, J. A.; Castro, M. D. L.; Valcárcel, M.; *Anal. Chim. Acta*; 242, 1991, 179.
60. Li, M. G.; Madappally, M. M.; *Clin. Chem.*; 35, 1989, 2330.
61. Yamato, S.; Wakabayashi, H.; Nakajima, M.; Shimada, K.; *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*; 656, 1994, 29.
62. Leon, L. E.; Ríos, A.; Castro, M. D. L.; Valcárcel, M.; *Anal. Chim. Acta*; 234, 1990, 227.
63. Hatch, M.; *Clin. Chim. Acta*; 193, 1990, 199.
64. Leyva, J. A. M.; Artiga, M. P. H.; Méndez, M. M. A.; Pérez, J. J. Q.; *Clin. Chim. Acta*; 195, 1990, 47.
65. Albrecht, S.; Brandl, H.; Böhm, W-D; Beckert, R.; Kroschwitz, H; Neumeister, V.; *Anal. Chim. Acta*; 255, 1991, 413.
66. Hansen, E. H.; Winther, S. K.; Gundstrup, M.; *Anal. Lett.*; 27; 1994; 1239.
67. Leon, L. E.; Ríos, A.; Castro, M. D. L.; Valcárcel, M.; *Analyst*; 115, 1990, 1549.
68. Millán, A.; Grases, J. M.; Grases, F.; *J. Chromatogr.*; 529, 1990, 402.
69. Egashira, N.; Kumasako, H.; Kurauchi, Y.; Ohga, K.; *Anal. Sci.*; 10, 1994, 405.
70. Patricia Cunniff (ed); Oxalic Acid in Canned Vegetables (Método 974.24) in "Official Methods of Analysis of AOAC International"; USA; 16ª ed.; 1995.
71. Albrecht, S.; Brandl, H.; Schönfels, C.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*; 33, 1994, 1780.

72. Pundir, C. S.; Kunchal, N. K.; *Clin. Chem.*; 39, 1993, 1750.
73. Reddy, S. M.; Higson, S.P.; Vadgama, P. M.; *Anal. Chim. Acta*; 343, 1997, 59.
74. Pundir, C. S.; Kunchal, N. K.; Bhargava, A. K.; *Biotech. Appl. Biochem.*; 27, 1998, 103.
75. Fernandes, J. R.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L.T.; Tubino, M.; *Anal. Commun.*; 33; 1996; 397.
76. Lathika, K. M.; Inamdar, K. V.; Tarachand, U.; Singh, B. B.; Raghavan, K. G.; *Anal. Lett.*; 28, 1995, 425.
77. Petrarulo, M.; Cerelli, E.; Marangella, M.; Cosseddu, D.; Vitale, C.; Linari, F.; *Clin. Chem.*; 40, 1994, 2030.
78. Glazier, S. A.; Rechnitz, G. A.; *Anal. Lett.*; 22, 1989, 2929.
79. Schomburg, D.; Salzmann, M.; Stephan, D.; "Enzyme Handbook"; Springer Verlag, Berlim, vol 6; 1993.
80. Pundir, C. S.; *Phytochemistry*; 30, 1991, 1065.
81. Requena, L.; Bornemann, S.; *Biochem. Soc. Trans.*; 26, 1998, 5273.
82. Requena, L.; Bornemann, S.; *J. Inorg. Biochem.*; 74, 1999, 275.
83. Dunford, H. B.; Stillman, J. S.; *Coord. Chem. Rev.*; 196, 1976, 187.
84. Lindgren, A.; Emnéus, J.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; Vargas, G. M.; *Anal. Chim. Acta*; 347, 1997, 51.
85. Rosatto, S. S.; Kubota, L. T.; Oliveira Neto, G.; *Anal. Chim. Acta*; 390, 1999, 65.
86. Lei, C.; Zhang, Z.; Liu, H.; Kong, J.; Deng, J.; *Anal. Chim. Acta*; 332, 1996, 73.
87. Larsen, E. M.; Vissers, D. R.; *J. Phys. Chem.*; 64, 1960, 1732.
88. Kubota, L. T.; Gushikem, Y.; Castro, S.; Moreira, J. C.; *Colloids Surf.*; 57, 1991, 11.
89. Popescu, I. C.; Zetterberg, G.; Gorton, L.; *Biosen. Bioelectron.*; 10, 1995, 443.
90. Ottaway, J. M.; Bishop, E. (ed); "Indicators"; Pergamon Press; Oxford; 1972; p. 469.
91. Csöregi, E.; Jönsson-Petterson, G.; Gorton, L.; *J. Biotechnol.*; 30, 1993, 315.