

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**LIDIANE RAQUEL VEROLA MATAVELI**

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MINIBIOSSENSOR  
POTENCIOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE ADRENALINA EM  
AMOSTRAS DE INTERESSE FARMACÊUTICO

ALFENAS/MG  
2007

LIDIANE RAQUEL VEROLA MATAVELI

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MINIBIOSSENSOR PARA  
DETERMINAÇÃO DE ADRENALINA EM AMOSTRAS DE INTERESSE  
FARMACÊUTICO

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Alfenas, para obtenção do título  
de Mestre em Ciências Farmacêuticas,  
Área de Concentração: Análise Físico-  
Química e Microbiológica de Fármacos  
Orientador: Pedro Orival Luccas

ALFENAS/MG  
2007

Mataveli, Lidiane Raquel Verola.

Construção e caracterização de um minubiossensor potenciométrico para determinação de adrenalina em amostras de interesse farmacêutico / Lidiane Raquel Verola Mataveli - Alfenas, 2007.

81 f. -

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas.  
Bibliografia

1. Adrenalina. 2. Biossensores. 3. Potenciometria. I. Título.

CDD: 543.4

LIDIANE RAQUEL VEROLA MATAVELI

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MINIBIOSSENSOR PARA  
DETERMINAÇÃO DE ADRENALINA EM AMOSTRAS DE INTERESSE  
FARMACÊUTICO

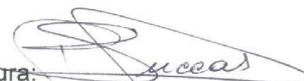
Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Alfenas, para obtenção do título  
de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área  
de Concentração: Análise Físico-Química e  
Microbiológica de Fármacos

Aprovada em: 22/12/2007

Prof.º: Dr. Pedro Orival Luccas

Instituição: Unifal - MG

Assinatura:



Prof.º: Dr. César Ricardo Teixeira Tarley

Instituição: Unifal - MG

Assinatura:



Prof.º: Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva

Instituição: Unifal - MG

Assinatura:



A DEUS ! AOS MEUS PAIS, IRMÃO E  
TODA FAMÍLIA, QUE ACOMPANHOU  
MINHA JORNADA E REZOU POR MIM  
DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Tantas pessoas para agradecer, me perdoem se esqueci algum nome...

Primeiro e como não poderia deixar de ser, primeiro tenho que agradecer ao meu orientador Prof. Pedro ... quanto tempo me agüentando!! Obrigada por tudo.

Ao pessoal do laboratório. Tantas horas juntos, formamos uma família. Marina, Adriano, Re, Naty, Gustavo, Gil, Marília, Lê, Camila, Ju ... OBRIGADA!

As meninas da República Malagueta que agüentaram meus "surtos" quando nada dava certo no laboratório.

Professores!!! Principalmente a Prof.<sup>a</sup> Maisa, Prof.<sup>a</sup> Lúcia, Prof.<sup>o</sup> Célio e Prof.<sup>o</sup> Alexandre que me ajudaram na realização deste trabalho.

Por último, mas muito importante Naty e Gu valeu pela ajuda!!

Meus sinceros agradecimentos

**Se, a princípio, a idéia não é absurda, então não há esperança para ela.**

**Albert Einstein**

## RESUMO

A polifenoloxidase (PFO) é uma enzima cúprica que catalisa a oxidação de difenóis em quinonas e tem ampla distribuição entre os vegetais. A atividade dessa enzima foi medida para a construção de um biossensor, para determinação de adrenalina, e os melhores resultados foram obtidos com a banana (*Musa sp.*). O cálculo da atividade enzimática proporcionou um valor de 974 UA (Unidades de Atividade). O biossensor foi construído com pasta de carbono, 50 UA em tampão fosfato (pH= 7,00) suportada em agulha de aço inoxidável ou tubo de polietileno.

Constatou-se morosidade no restabelecimento da linha base a qual foi corrigida com a adição de  $H_2O_2$  na solução diminuindo o tempo para 10 minutos. O biossensor (com polietileno) apresentou resposta linear para adrenalina, em solução tampão, entre  $8,00 \times 10^{-9}$  e  $8,00 \times 10^{-4}$  mol  $L^{-1}$  (LD =  $8,00 \times 10^{-9}$  mol  $L^{-1}$ ). Para amostras de medicamentos os resultados obtidos com o método proposto e com o método descrito na Farmacopéia Brasileira (1977) foram concordantes. Para amostras de sangue, usando calibração por ajuste de matriz, a faixa linear foi de  $8,00 \times 10^{-7}$  a  $8,00 \times 10^{-3}$  mol  $L^{-1}$  (LD =  $8,00 \times 10^{-7}$  mol  $L^{-1}$ ). Obteve-se 89,4 % nos testes de recuperação. Testes *in vivo*, onde os eletrodos foram inseridos na veia jugular de ratos Wistar, apresentaram resultados promissores.

Palavras-chave: Adrenalina. Biossensores. Potenciometria.

## ABSTRACT

Polyphenoloxidase (PPO) is a cupric enzyme that catalyzes the oxidation of diphenols in quinones and is widely distributed among the vegetables. The activity of this enzyme was measured for a biosensor construction for adrenaline determination, and the banana (*Musa sp.*) extract presented better results. The calculation of the enzymatic activity provided a value of 974 UA (Units of Activity). It was constructed biosensor with: carbon paste containing 50 UA in phosphate buffer (pH=7,00), into stainless steel needles or polyethylene tube. Slow reestablishment of the baseline was evidenced and it was corrected with the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the solution, decreasing the return time to 10 minutes. The biosensor (with polyethylene) provides a linear range from 8,00x10<sup>-9</sup> to 8,00x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> (LOD = 8,00x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup>) in buffer solution for adrenalin. The results obtained with the proposed method and the Farmacopéia Brasileira (1977) was in agreement. For blood samples, using matrix matching calibration, the linear range was from 8,00x10<sup>-7</sup> to 8,00x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> (LOD = 8,00x10<sup>-7</sup>). In the recovery tests, 89,4% of the added value was obtained. *In vivo* studies, electrodes were inserted in the jugular vein of the Wistar rat and showed promising results.

Keywords: Adrenaline. Biosensors. Potentiometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Oclusão em matriz de polímero.....	24
Figura 2 - Microencapsulação.....	25
Figura 3 - Adsorção física.....	26
Figura 4 - Ligação covalente em suporte.....	27
Figura 5 - Ligação cruzada. Fonte:FATIBELLO, CAPELATTO (1992).....	28
Figura 6 - Estrutura química da adrenalina: 1,2 –benzenodiol – 4 – (1- hidroxi – 2 – metilamina etil).....	31
Figura 7- Esquema dos procedimentos de preparação do extrato bruto enzimático.....	37
Figura 8 - Reação da epinefrina em presença de PFO, resultando na formação da epinefrinoquinona.....	38
Figura 9 - Procedimento adotado para medidas de atividade enzimática.....	39
Figura 10 - Procedimento adotado para preparo da pasta de grafite.....	40
Figura 11 - Desenho esquemático do minibiossensor.....	41
Figura 12 - Sensor fabricado com tubo de polietileno 0,4 mm d. i.....	41
Figura 13 - Ratos utilizados para medidas <i>in vivo</i> com eletrodos inseridos na cavidade peritoneal.....	44

Figura 14 - Ratos utilizados para medidas <i>in vivo</i> com eletrodos inseridos na veia jugular.....	44
Figura 15 - Velocidade de reação para diferentes concentrações de extrato bruto.....	46
Figura 16 - Medidas da atividade enzimática de: a : abobrinha; b : batata doce.....	48
Figura 17 - Medidas da atividade enzimática de: a : mandioca; b : batata.....	49
Figura 18 - Medidas da atividade enzimática de: a : inhame; b : berinjela.....	50
Figura 19 - Medida da atividade enzimática de banana ( <i>Musa sp.</i> ): a : 1 dia após preparação; b- 4 dias após preparação; c : 8 dias após preparação.....	51
Figura 20 - Resultados obtidos para o biossensor de agulha com EBE de banana com 50 unidades de enzima (em agulha). Curva obtida com concentrações entre $1,50 \times 10^{-3}$ e $1,10 \times 10^{-2}$ mol L <sup>-1</sup> , incrementos de $1,30 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> .....	54
Figura 21 - Estudo da influência da concentração de PFO na construção de biossensores. Sinais obtidos para solução de adrenalina $8,00 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> em tampão fosfato pH=7,00. As barras representam os desvios relativos para medidas em triplicata.....	55
Figura 22 - Influência do pH na resposta do biossensor, soluções aquosas de adrenalina ( $8,00 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> ) em tampão fosfato. As barras representam os desvios relativos para leituras em triplicatas.....	56

Figura 23 - Biossensores construídos com tubos de polietileno de calibres diferentes para terminações de $8,00 \times 10^{-5}$ e $8,00 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> de adrenalina.....	57
Figura 24 - Leitura de amostras de adrenalina $8,00 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> em: a : tampão fosfato pH=7,00; b- amostra de sangue.....	58
Figura 25 - Curva analítica obtida para biossensor de polietileno em tampão.....	59
Figura 26 - Curva analítica obtida para biossensor de polietileno em sangue.....	60
Figura 27 - Curva analítica de adrenalina, comprimento de onda: 280 nm.....	62
Figura 28 - Registros obtidos para injeção de adrenalina em um dos animais utilizados.....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de proteína; atividade calculada através da fórmula (F) e da curva de velocidade (C) seguidas de sua atividade específica (AE) definida como unidade por miligrama de proteína.....	47
Tabela 2 - Resposta de diferentes biossensores para solução: $1,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de adrenalina em tampão fosfato pH=7,00.....	53
Tabela 3 - Estudo de interferentes para solução $8,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de adrenalina.....	61
Tabela 4 - Determinação de adrenalina por espectrofotometria UV e biossensor potenciométrico.....	63

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Analitos determinados utilizando-se biossensores com detecção potenciométrica.....	19
Quadro 2 - Analitos determinados usando biossensores com detectores óticos.....	20
Quadro 3 - Analitos determinados utilizando-se biossensores piezoelétricos.....	21
Quadro 4 - Técnicas utilizadas na determinação de adrenalina e suas respectivas faixas de resposta.....	33
Quadro 5 - Substâncias utilizadas no preparo do biossensor.....	40
Quadro 6 - Eletrodos para adrenalina encontrados na literatura.....	60

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	<b>BIOSSENSORES</b> .....	16
1.2.1	Transdutores Amperométricos.....	17
1.2.2	Transdutores Coulométricos.....	18
1.2.3	Transdutores Potenciométricos.....	18
1.2.4	Transdutores Condutométricos.....	19
1.2.5	Transdutores Óticos.....	19
1.2.6	Cristais Piezoelétricos.....	20
1.3.1	Material Biológico: Enzimas.....	21
1.3.2	Material Biológico: Tecidos.....	22
1.3.3	Material Biológico: Microorganismos.....	22
1.3.4	Material Biológico: Anticorpos .....	23
1.3.5	Material Biológico: Ácidos nucleicos .....	23
1.4	<b>IMOBILIZAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO</b> .....	23
1.4.1	Oclusão em matriz de polímero .....	24
1.4.2	Microencapsulação.....	25
1.4.3	Adsorção física .....	25
1.4.4	Ligação covalente em suporte.....	27
1.4.5	Ligação cruzada .....	27
1.5	<b>POLIFENOLOXIDASE</b> .....	28
1.6	<b>MEDIDAS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA</b> .....	29
1.7	<b>ADRENALINA</b> .....	30
1.8.	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
1.9.	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	34
2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
2.1	<b>REAGENTES</b> .....	35
2.2	<b>EQUIPAMENTOS</b> .....	36
2.2.1	Outros Materiais.....	36

2.3.1	Obtenção do extrato bruto enzimático (EBE).....	37
2.3.2	Determinação da atividade enzimática.....	38
2.3.3	Determinação da concentração de proteína total pelo método de Biureto.....	39
2.3.4	Preparação do sensor .....	39
2.3.5	Preparo do eletrodo referência Ag/AgCl .....	42
2.3.6	Avaliação e caracterização do sensor .....	42
2.3.7	Amostras .....	43
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46
3.1	CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	46
3.2	ESTUDO DA FONTE ENZIMÁTICA.....	47
3.3	CONSTRUÇÃO DOS SENSORES .....	52
3.4	BIOSSENSORES UTILIZANDO TUBOS DE POLIETILENO.....	54
3.5	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS : BIOSSENSOR DE POLIETILENO (D.I. 0,4 MM).....	59
3.6	ESTUDO DE INTERFERENTES.....	61
3.7	AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO.....	62
3.8	MEDIDAS <i>IN VIVO</i> .....	63
4	<b>CONCLUSÕES</b> .....	67
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	68
	<b>ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética</b>	76
	<b>APÊNDICE A – Artigo Publicado pela revista Infarma</b>	78

## 1 INTRODUÇÃO

A adrenalina é uma catecolamina liberada naturalmente no sangue circulante pelo sistema nervoso simpático e pela medula supra renal. Em média, cerca de 80% das catecolaminas liberadas pela medula das adrenais corresponde à adrenalina, a qual apresenta ações farmacológicas por excitar os receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos, atuando no coração, vasos sanguíneos, pressão arterial, metabolismo, sistema nervoso central e musculatura lisa.

As concentrações fisiológicas das catecolaminas são na ordem de nanomolares e picomolares. O método mais utilizado para a análise dessas substâncias é a CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), que requer um pré-tratamento extensivo da amostra (SZEAPONIK et al., 1995).

Dentre as alternativas utilizadas para determinação da adrenalina, cita-se o biossensor. Trata-se de um sensor que utiliza um material biológico conectado a um transdutor. Um biossensor eletroquímico tem sido definido como um dispositivo integrado com conteúdo próprio, capaz de promover informação quantitativa ou semi-quantitativa usando um elemento biológico específico de reconhecimento retido em contato espacial direto com um elemento transdutor eletroquímico (THEVENOT et al., 2001).

O material biológico é imobilizado em uma membrana adequada, que é acoplada à superfície do transdutor. Esse dispositivo monitorará o desaparecimento de algum reagente ou aparecimento de algum produto da reação do material biológico com o substrato de interesse.

As principais características de um biossensor são: boa seletividade; relativo baixo custo de construção e estocagem; potencial para miniaturização; facilidade de automação e construção de equipamentos portáteis. Os elementos biológicos utilizados podem ser: enzimas, extrato bruto enzimático, tecido animal e vegetal, anticorpos, antígenos, células, organelas, ácido nucléico, receptores, sendo que a escolha do elemento biológico do biossensor depende do analito estudado (ROSATTO et al., 2001).

Os componentes biológicos mais utilizados são as enzimas, que catalisam com grande eficiência as reações biológicas e possuem grande seletividade. A imobilização da enzima no biossensor deve se dar de maneira adequada para não desnaturar seu centro ativo. Alguns métodos utilizados para imobilização de enzimas

são: oclusão em gel, microencapsulação, adsorção física e/ou química, ligação química covalente, ligação química covalente cruzada (WILSON; GIFFORD, 2005).

Quanto aos transdutores, nota-se a predominância do amperométrico, seguido do potenciométrico. Contudo, menciona-se também condutométrico, ópticos e cristais piezoelétricos.

## 1.1 BIOSSENSORES

O termo biossensor surgiu na literatura científica no fim dos anos 70. Entretanto, o conceito e mesmo a comercialização dos biossensores veio antes disso. O primeiro biossensor conhecido como “eletrodo de enzima” foi demonstrado por Clark e Lyons (1962), quando acoplaram a enzima glicose oxidase a um eletrodo amperométrico para medidas de  $O_2$ . A oxidação catalisada pela enzima diminuiu a quantidade de  $O_2$  na solução teste. Essa diminuição foi registrada pelo eletrodo e mostrou ser proporcional à concentração de glicose na amostra. Nos anos que se seguiram, os eletrodos de enzima para uma variedade de outras substâncias clinicamente importantes foram demonstrados acoplando as enzimas apropriadas ao sensor eletroquímico. Então, Rechnitz et al. (1977) imobilizaram microorganismos vivos na superfície de um eletrodo seletivo para o aminoácido arginina e denominaram-no de sensor bio-seletivo, os autores afirmaram que deixar uma enzima em seu ambiente natural aperfeiçoaria sua atividade biológica e melhoraria as características do sensor. O sensor bio-seletivo foi depois encurtado para biossensor e o termo se manteve popular para a união entre um material de origem biológica e um transdutor físico - químico. Os “designs” e as aplicações dos biossensores em vários campos da química analítica têm continuado a crescer desde então.

Como aplicações práticas, biossensores para medição de glicose em sangue integral, plasma e urina têm sido os mais estudados e comercializados ultimamente. A necessidade de diagnosticar e gerenciar um problema mundial de saúde, que é a diabetes *mellitus*, tem sido a força motora dos esforços acadêmicos e comerciais para o desenvolvimento de biossensores de glicose.

Os aparelhos comerciais para medição de glicose são usados em vários locais de cuidado à saúde incluindo laboratórios, hospitais, postos de saúde e por pacientes para monitoramento próprio da glicose no sangue. A aplicação de biossensores para monitoração de glicose é a razão principal para que o mercado mundial desses aparelhos, em 2001, tenha sido estimado em US\$1,5 bilhões (NEWMAN et al., 2001).

De acordo com a IUPAC, um biossensor é definido como um tipo específico de sensor químico que compreende um elemento de reconhecimento biológico e um transdutor físico-químico (THÉVENOT et al., 2001). O elemento biológico é capaz de reconhecer a presença, atividade ou concentração de um analito em solução. O reconhecimento pode ser tanto por um processo de ligação quanto por uma reação biocatalítica. A interação de um elemento de reconhecimento com o analito alvo resulta em uma mudança mensurável na propriedade da solução, como a formação de um produto. O transdutor converte a mudança na solução em um sinal elétrico quantificável.

### 1.2.1 Transdutores Amperométricos

Biossensores baseados em transdutores eletroquímicos são os mais comuns e mais frequentemente citados na literatura. A amperometria é a técnica eletroquímica geralmente aplicada em biossensores disponíveis comercialmente. É uma técnica eletroquímica que tira vantagem do fato de certas espécies químicas serem oxidadas ou reduzidas em eletrodos de metais inertes quando se aplica um potencial constante. Essas espécies químicas são conhecidas como substâncias eletroativas. Três eletrodos compreendem uma célula amperométrica. O eletrodo de trabalho é geralmente constituído de um metal como platina, carbono vítreo ou ouro. Um eletrodo referência, geralmente Ag/AgCl que promove um potencial fixo contra o qual o potencial aplicado no eletrodo de trabalho é medido e controlado, e um contra eletrodo que possibilita a aplicação de potencial, juntamente com o eletrodo de trabalho, no sistema em estudo. As espécies a serem monitoradas difundem para a superfície do eletrodo, onde ocorre a reação de oxirredução. A corrente resultante está relacionada à concentração do analito (D'ORAZIO, 2003).

### 1.2.2 Transdutores Coulométricos

Técnica eletroquímica relacionada com a amperometria, onde a quantidade de carga (coulombs) passando entre 2 eletrodos é medida. A quantidade de carga é diretamente proporcional à oxidação ou redução de uma substância eletroativa em um dos eletrodos. O número de coulombs transferido nesse processo é relatado como quantidade de substância eletroativa pela lei de Faraday:

$$n = Q/zF \quad (1)$$

Sendo que  $z$  é o número de elétrons transferidos na reação de oxidação ou redução,  $n$  é a quantidade de substância reduzida ou oxidada em moles,  $F$  é a constante de Faraday (96,487 C/mol) e  $Q$  é a quantidade de carga passando através da célula em coulombs (D'ORAZIO, 2003, p. 42).

Os biossensores coulométricos não são muito comuns. Como exemplos pode-se citar a determinação de pesticidas organofosforados e também a identificação de subespécies viáveis de *Escherichia coli* (EVERETT; RECHNITZ, 1998; ERTL et al., 2003).

### 1.2.3 Transdutores Potenciométricos

A potenciometria consiste na medida da diferença de potencial entre dois eletrodos quando a corrente da célula é zero. Os dois eletrodos são conhecidos como indicador e referência. O eletrodo indicador desenvolve um potencial variável dependendo da atividade ou concentração do analito na solução esse potencial é medido em relação a um eletrodo de referência. A mudança no potencial é relacionada à concentração de maneira logarítmica (EGGINS, 1999).

Existem vários exemplos de biossensores utilizando detectores potenciométricos, como pode ser visto no Quadro 1.

Quadro 1 - Analitos determinados utilizando-se biossensores com detecção potenciométrica.

<b>Analito</b>	<b>Autores</b>
Uréia	RAJESH et al.(2005)
Etanol	ROTARIU; BALA; MAGEARU (2004)
Acetilcolinesterase	REHER; LEPKA; SCHWEDT (2002)
Glicose	KORMOS; SZIRÁKI; TARSICHE (2000)
Ácido L – Ascórbico	FERNANDES; KUBOTA; NETO (1999)
Lisina	SAURINA (1998)
Triglicerídeos	REDDY et al. (2003)

#### 1.2.4 Transdutores Condutométricos

Uma mudança na condutividade da solução tem sido usada como mecanismo de transdução em biossensores baseados em enzimas. Condutometria é a medida da habilidade de íons em solução de carregar corrente entre os eletrodos, quando um potencial alternado é aplicado entre dois eletrodos inertes. Algumas reações enzimáticas, produzindo uma mudança na força iônica da amostra, podem ser monitoradas por dispositivos condutométricos. As aplicações de biossensores condutométricos são limitadas e há necessidade de medir pequenas mudanças de condutividade em meios com grande força iônica. Um eletrodo branco (controle) deve ser usado (D'ORAZIO, 2003).

#### 1.2.5 Transdutores óticos

Os transdutores óticos mais comuns são baseados nas técnicas: absorção, refletância, luminescência, quimiluminescência, interferometria entre outras.

Os instrumentos óticos apresentam vantagens tais como dispensar o uso de eletrodo de referência; ausência de interferência elétrica; um reagente imobilizado não precisa estar em contato com as fibras óticas; os aparelhos utilizados são altamente estáveis com relação à calibração; podem responder simultaneamente a

mais de um analito; têm potencial para um conteúdo maior de informações do que os transdutores elétricos.

As desvantagens consistem em: funcionam somente se reagentes apropriados forem desenvolvidos; sistemas sujeitos à interferência da luz do ambiente; são de difícil miniaturização; são menos sensíveis; os tempos de resposta podem ser longos (EGGINS, 1999).

No quadro a seguir estão listados alguns biossensores com detectores óticos.

Quadro 2 - Analitos determinados usando biossensores com detectores óticos.

<b>Analito</b>	<b>Autores</b>
Glicose	MORENO – BONDI et al.(1990)
Bilirrubina Sérica	LI; ROSENWEIGZ (1997)
Colesterol	TRETTNAK; WOLFSBEIM (1990)
Impurezas da Água	FRENSE; MULLER; BECKMANN (1998)
L-alanina, $\alpha$ -quetoglutarato	JANASEK; SPOHN (1999)

### 1.2.6 Cristais piezoelétricos

A microbalança piezoelétrica de cristal de quartzo (QMC) é um equipamento de medida de massa, que opera de acordo com o princípio de Sauerbrey: qualquer mudança na massa do cristal muda a frequência natural de oscilação da QMC proporcionalmente como descrito na equação:

$$\Delta F = -2,27 \times 10^{-6} \cdot F_0 \Delta m/A \quad (2)$$

Onde: F é a frequência medida,  $F_0$  é a frequência fundamental do cristal de quartzo; A é a área revestida e  $\Delta m$  é a variação de massa devido à deposição na superfície (SU; LI, 2001).

No quadro 3, podem ser observados alguns analitos determinados utilizando-se biossensores piezoelétricos. Uma área que tem despertado grande atenção são os cristais revestidos com anticorpos, que oferecem grande seletividade.

Quadro 3 - Analitos determinados utilizando-se biossensores piezoelétricos.

<b>Analito</b>	<b>Autores</b>
Anticorpos de BSA	SHONS; DORMAN; NAJARIAN (1972)
Anticorpos para HIV	KÖSSLINGER et al. (1994)
Pesticidas (atrazina)	GUILBAULT; HOCK; SCHMID (1992)
Biossensores de DNA	STORRI et al. (1998)
Cocaina	ATILLI.; SULLEIMAN (1996)
Atropina	WHANZI et al. (1993)

### 1.3.1 Materiais biológicos: Enzimas

Uma enzima é uma macromolécula complexa, geralmente uma proteína, sendo que 1/3 das substâncias dessa classe contêm um grupo prostético que inclui um ou mais átomos de metal. Em muitas enzimas, especialmente as utilizadas para a construção de biossensores, o modo de ação envolve uma reação de oxidação ou redução que pode ser detectada eletroquimicamente.

A utilização de enzimas na construção de biossensores possui certas vantagens: elas se ligam ao substrato, são altamente seletivas, têm atividade catalítica aumentando a sensibilidade, agem rapidamente. Algumas desvantagens podem estar presentes: o custo da fonte, da extração, do isolamento e da purificação das enzimas é muito alto. Além disso; há perda de atividade quando imobilizadas em um transdutor; levando à desativação depois de um período curto de tempo. Porém uma grande gama de enzimas está disponível comercialmente, geralmente com características bem definidas e testadas (EGGINS, 1999).

Apesar das desvantagens mencionadas, as enzimas consistem do material biológico mais utilizado para construção de biossensores.

Uma alternativa viável para contornar alguns pontos desfavoráveis na utilização das enzimas, como estabilidade e alto custo, e que tem apresentado desempenho satisfatório é o uso de extrato bruto enzimático, que além de ser mais econômico e estável, possui um tempo de vida superior ao das enzimas purificadas (FATIBELLO; VIEIRA, 2002).

### 1.3.2 Materiais biológicos: Tecidos

Tecidos de plantas e animais podem ser utilizados diretamente com mínima preparação. Geralmente tecidos contêm uma multiplicidade de enzimas e podem não ser tão seletivos quanto às enzimas purificadas. Entretanto as enzimas ficam em seu ambiente natural e estão menos sujeitas a perda de atividade. Por outro lado a resposta pode ser mais lenta, pois há uma maior diversidade de materiais para que o substrato possa se difundir.

Microorganismos e tecidos são materiais que englobam diferentes meios que envolvem as enzimas, o que resulta em diferentes vantagens e desvantagens. São ambos mais baratos do que enzimas isoladas e os biossensores confeccionados apresentam maior tempo de utilização. A enzima pode ser mais estável à inibição por solutos, mudanças de temperatura e pH. A maior desvantagem é a falta de seletividade, pois contêm uma mistura de enzimas (EGGINS, 1999).

### 1.3.3 Materiais biológicos: Microorganismos

Microorganismos podem assimilar compostos orgânicos resultando em mudança da atividade respiratória, e podem assim produzir metabólitos eletroativos.

A utilização de microorganismos evita etapas de purificação, e preserva a enzima em seu ambiente natural protegendo-a de inativação por agentes tóxicos externos, tais como metais pesados (LEI; CHEN; MULCHANDANI, 2006).

Tem como vantagens: serem uma fonte de enzima mais barata do que enzimas isoladas, menos sensíveis à inibição por solutos e mais tolerantes a mudanças de temperatura e pH, têm maior tempo de vida. Suas desvantagens são: algumas vezes têm maior tempo de resposta, tem tempos maiores de recuperação, e tal como os tecidos, têm muitas enzimas o que pode diminuir a seletividade (EGGINS, 1999).

#### 1.3.4 Materiais biológicos: Anticorpos

Organismos desenvolvem anticorpos que são proteínas que podem se ligar com um antígeno invasor e removê-lo. O analito de interesse se comporta então como o antígeno.

Anticorpos têm sido usados em imunoenaios há muito tempo, utilizando a alta seletividade decorrente do reconhecimento molecular dos anticorpos.

Esse tipo de material biológico é muito seletivo, ultra-sensível e se liga fortemente. A grande desvantagem do uso desse tipo de material biológico é que não há, na grande maioria das vezes, o efeito catalítico presente quando se utilizam as enzimas (EGGINS, 1999).

#### 1.3.5 Materiais biológicos: Ácidos nucleicos

A especificidade que surge das moléculas complementares de DNA para duplicar ou hibridizar pelo pareamento de bases oferece uma maneira simples de detectar seqüências marcadas de DNA em uma amostra.

Novas tecnologias de biossensores têm sido investigadas baseando-se na imobilização de filamentos de DNA em diferentes transdutores físico-químicos que convertem o evento da hibridização num sinal elétrico ou ótico.

Esses biossensores, têm grande aplicação em diagnóstico de doenças hereditárias, monitoramento de expressão de genes e detecção rápida de infecções patogênicas ( EGGINS, 1999).

### 1.4. IMOBILIZAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Existem muitos métodos de imobilização de material biológico, porém estes não podem desnaturar o centro ativo das enzimas utilizadas nos biossensores,

devendo ser realizada por meio dos vários grupos que não possuem atividade catalítica.

#### 1.4.1 Oclusão em matriz de polímero

Envolve confinamento da enzima dentro dos espaços intersticiais das ligações covalentes cruzadas de um polímero insolúvel (poliacrilamida, nylon, polímeros condutores como o polipirrol, entre outros). Neste processo, o monômero, o catalisador de polimerização e a enzima a ser ocluída são misturados em uma solução tampão. A estrutura do polímero formada não permite a difusão de moléculas grandes de enzima pelos espaços intersticiais, mas as moléculas menores do substrato podem difundir-se livremente (CAPELATO; FATIBELLO 1992).

A vantagem desse método é que a reação entre substrato e enzima não sofre grandes modificações, pois a imobilização praticamente não altera a estrutura da enzima. Essa técnica possui algumas desvantagens: barreiras são criadas inibindo a difusão do substrato que diminui a velocidade da reação e o tempo de resposta do sensor; há perda de atividade enzimática através dos poros do gel (EGGINS, 1999).

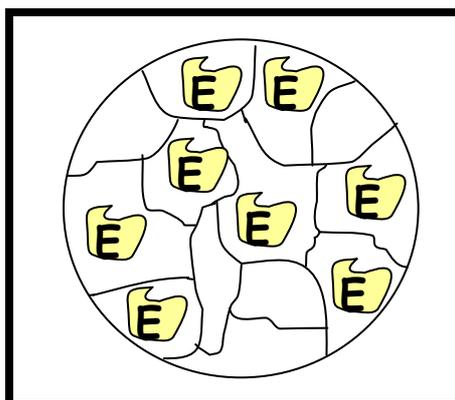


Figura 1 - Oclusão em matriz de polímero.

### 1.4.2 Microencapsulação

Envolve o confinamento das enzimas em pequenas esferas de membranas semipermeáveis com poros que permitem a livre movimentação de substrato e produtos da reação enzimática. O principal tipo de membrana utilizada são as de acetato de celulose, poliacrilamida, policarbamato, colágeno e polifluoretileno (PTFE). Foi o método usado para o primeiro biossensor de glicose no eletrodo de oxigênio (EGGINS, 1999).

Tem como vantagens a fixação próxima entre o material biológico e o transdutor, e permite a imobilização simultânea de várias enzimas. Tem boa estabilidade quando é exposto a mudanças de temperatura, pH, força iônica,  $E^0$  e concentração de substrato. Além disso, sua configuração limita a contaminação e a biodegradação e ainda previne contaminação se usada "in vivo".

Porém, a necessidade de alta concentração de proteína para a microencapsulação, a restrição de passagem de substrato de baixo peso molecular através dos poros da membrana e dificuldades em se fixar essas microcápsulas na base dos sensores dificulta a aplicação desta técnica.

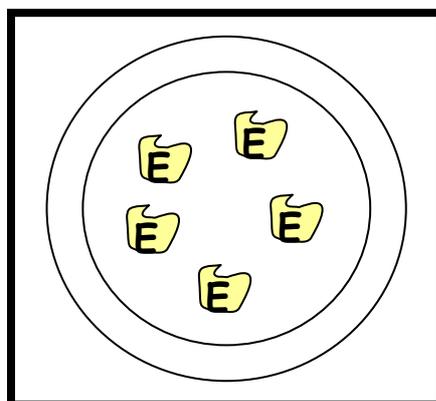


Figura 2 - Microencapsulação.

### 1.4.3 Adsorção física

A adsorção do material biológico em suportes insolúveis resulta em interações do tipo iônico, polar, ligações de hidrogênio ou hidrofóbicas. Muitas substâncias

adsorvem enzimas em suas superfícies, tais como alumina, celulose, grafite, sílica-gel, vidro e colágeno. Nenhum reagente é necessário, não há passo de limpeza e há menor ruptura da estrutura enzimática.

A grande vantagem desse método é a simplicidade e a grande variedade de suportes que podem ser utilizados, possui, porém, a desvantagem de a enzima adsorvida ser extremamente dependente de fatores tais como pH, solvente, substrato e temperatura (SCOUTEN; LUONG; BROWN, 1995).

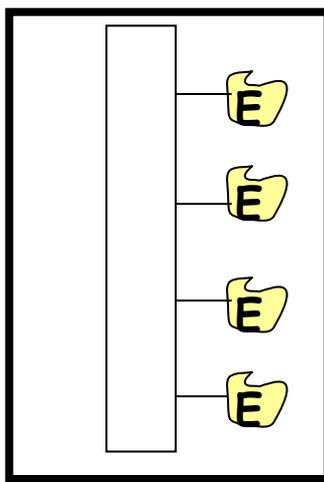


Figura 3 - Adsorção física.

#### 1.4.4 Ligação covalente em suporte

Realizada por meio de ligação covalente de grupos funcionais não ativos da enzima a grupos reativos (hidroxila, carbonila, fenol, tiol, imidazol, amino) ligados na superfície sólida de um suporte insolúvel. Para proteger o sítio ativo, a reação é conduzida na presença do substrato (EGGINS, 1999).

Os suportes insolúveis mais utilizados incluem polímeros sintéticos (agar-agar, dextrana, sefarose, etc) e materiais inorgânicos (óxidos metálicos e pérolas de vidro com porosidade controlada).

A vantagem desse método é que a enzima não será liberada durante o uso, pois forma um complexo estável com o suporte mostrando-se assim satisfatório para produção e comercialização. Como desvantagem, além do processo de imobilização ser complicado e consumir tempo, existe a possibilidade de perda de atividade devido à reação de imobilização envolver grupos funcionais necessários para a

atividade biológica, o que pode ser minimizado pela imobilização na presença do substrato ou inibidor do material biológico (SCOUTEN; LUONG; BROWN, 1995).

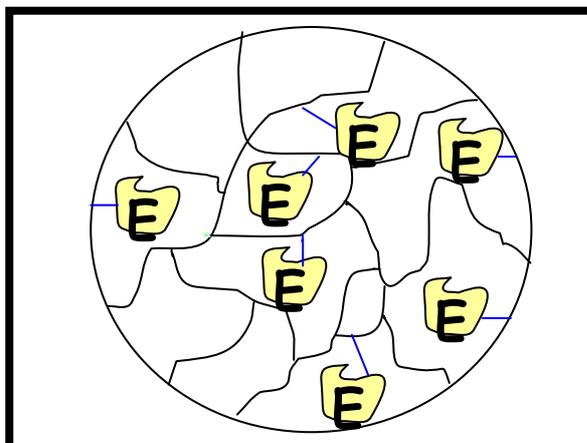


Figura 4 - Ligação covalente em suporte.

#### 1.4.5 Ligação cruzada

A ligação cruzada utiliza reagentes bifuncionais para ligar o biomaterial a suportes sólidos. O método baseia-se na formação de partículas macroscópicas em decorrência da formação de ligações cruzadas entre as moléculas de enzimas e/ou moléculas de suporte inerte com reagentes funcionais. Alguns dos reagentes utilizados são glutaraldeído, hexametileno diisocianato e 1,5 – dinitro – 2,4 – difluorobenzeno (EGGINS, 1999).

É um procedimento simples que possibilita forte ligação química das biomoléculas, também é muito usado na estabilização de enzimas adsorvidas fisicamente que são covalentemente ligadas a um suporte. Existem algumas desvantagens quando se utiliza esse método: além da reação utilizada ser de difícil controle, causa danos à enzima, portanto é necessária uma grande quantidade desta, além de limitar a difusão do substrato (SCOUTEN; LUONG; BROWN; 1995).

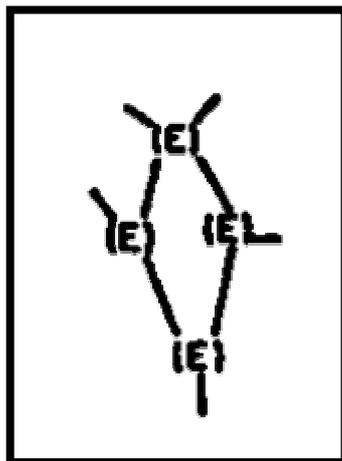


Figura 5 - Ligação cruzada. Fonte: FATIBELLO, CAPELATTO (1992).

## 1. 5 POLIFENOLOXIDASE

A enzima utilizada no presente trabalho foi uma polifenoloxidase.

As enzimas polifenoloxidase (PFO), também conhecidas como catecol oxidases, tirosinases ou catecolases, foram descobertas em 1985 por Bourquelot e Bertrand e são amplamente distribuídas, ocorrendo em animais, plantas, fungos e bactérias (ÜNAL, 2007).

PFO são enzimas com um centro dinuclear de cobre, que são capazes de inserir oxigênio em um grupo hidroxila de um anel aromático existente, seguida pela oxidação do difenol à quinona correspondente (MAYER, 2006). As quinonas são compostos que podem espontaneamente complexar vários tipos de moléculas em grandes estruturas, incluindo proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos, levando a formação de uma variedade de compostos escuros. Está então associada à deterioração de alimentos, provocando o chamado escurecimento enzimático.

A função fisiológica da PFO em células de plantas está ainda indefinida, porém muitos relatos indicam que seria de defender a planta contra patógenos e ataques de insetos (MELO; SHIMIZU; MAZZAFERA, 2006). O fato da atividade da PFO poder ser induzida por fatores bióticos e abióticos, como danos causados por herbívoros, fungos e bactérias, danos mecânicos, regurgitação de insetos e por tratamentos com compostos que sinalizam a via octadecanóide, é evidência adicional do envolvimento das PFO nos mecanismos de defesa das plantas.

O modo de ação proposto para as PFO é baseado na sua capacidade de oxidar compostos fenólicos quando o tecido é danificado (MELO, SHIMIZU, MAZZAFERA, 2006). Nessa situação a ruptura dos plastídios, o compartimento celular onde se encontra as PFO, leva a enzima a entrar em contato com os compostos fenólicos liberado pela ruptura do vacúolo, a principal organela armazenadora desses compostos.

As quinonas formadas podem agir de várias maneiras levando à proteção das plantas por meio de sua alta capacidade de reagir com outros compostos celulares, elas podem limitar o desenvolvimento de doenças nos locais infectados, prevenindo o avanço da infecção e/ou gerando um ambiente tóxico que inibirá o crescimento dos patógenos dentro da célula; através da habilidade de alquilar proteínas, ligando-se covalentemente a aminoácidos susceptíveis a alquilação, como lisinas, cisteína e metionina, reduzindo a biodisponibilidade dessas proteínas; capacidade de reagir com outros compostos fenólicos, aumentando a formação de polímeros, ligações covalentes e condensação com mais proteínas, levando a barreiras adicionais que podem prevenir os patógenos de entrar na célula (MELO; SHIMIZU; MAZZAFERA, 2006).

## 1.6 MEDIDAS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade de enzimas pode ser medida pelo consumo de oxigênio utilizando-se a técnica de Warburg ou um eletrodo de oxigênio, determinação com Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAE) com detecção eletroquímica e também pode ser feita a determinação espectrofotométrica (DAWSON; MAGEE 1955; LI et al., 1988; SUMMER; MYRBACK, 1951).

Quanto às medidas espectrofotométricas, estas são utilizadas para se acompanhar o desenvolvimento de uma reação enzimática que possua um produto ou reagente que absorva radiação ultravioleta ou visível. Assim, em condições adequadas, a velocidade da reação é proporcional à quantidade de enzima presente no extrato. Como muitas enzimas ainda não são encontradas puras, não é possível quantificá-las, sendo os resultados expressos em unidades de atividade (UA), definidas arbitrariamente como a quantidade de enzima capaz de aumentar em

0,001 unidades de absorvância por minuto (LUPETTI et al., 2003; HARPER, 1973). Para o cálculo da atividade geralmente é utilizada a fórmula abaixo que relaciona variação de absorvância ( $\Delta$  abs), variação de tempo ( $\Delta$  T), o passo óptico (b) e um determinado volume de amostra (V) (SUMMER ; MYRBACK, 1951):

$$A \text{ (atividade)} = \Delta \text{ abs} \times 1000 / (\Delta T \times b \times V) \quad (3)$$

Outra maneira de calcular UA é através da medida da velocidade de reação para diferentes proporções de extrato e enzima, o que, em princípio, confere maior confiabilidade aos resultados (HARPER, 1973).

## 1.7 ADRENALINA

No presente trabalho foi desenvolvido um biossensor para a determinação de adrenalina.

A adrenalina (ou também chamada de epinefrina) é uma catecolamina, liberada pelo sistema nervoso simpático e pela medula supra-renal e que atua na regulação de várias funções fisiológicas, em particular na integração das respostas a uma grande variedade de estresses (GILMAN, 1996). As catecolaminas são necessárias para proporcionar respostas fisiológicas rápidas, em emergências tais como frio, fadiga e choque. Neste sentido mobilizam o que se chama de mecanismo de fuga ou luta (HARPER, 1973).

A adrenalina (Figura 6) funciona como hormônio atuando em locais distantes na circulação, apresentando ações farmacológicas nos seguintes setores do organismo (HARPER, 1973; SILVA, 2002):

- Sistema cardiovascular – causa vaso-dilatação nas arteríolas dos músculos esqueléticos e vaso-constricção das artérias da pele, das mucosas e das vísceras esplâncnicas. Também é eficaz como estimulante da ação cardíaca, aumenta irritabilidade, ritmo, força de contração do miocárdio e o rendimento cardíaco. Aumenta pressão sanguínea.
- Sistema nervoso central – os efeitos são em geral discretos e já que é uma substância polar e tem dificuldade de atravessar a barreira hematoencefálica. Efeitos

que sugerem estimulação central, como ansiedade, inquietação, tremores, são efetivamente decorrentes das ações respiratórias e metabólicas da adrenalina.

- Musculatura lisa das vísceras – causa relaxamento dos músculos lisos do estômago, intestino, bronquíolos e bexiga urinária, juntamente com contração dos esfíncteres no caso do estômago e bexiga. Outros músculos lisos podem ser contraídos. O efeito relaxante da epinefrina sobre a musculatura lisa bronquiolar torna este hormônio particularmente valioso no caso de ataques asmáticos.

Efeitos metabólicos: no fígado, estimula degradação do glicogênio, o que contribui para capacidade desta substância de elevar a glicose do sangue. *In vivo* a ação da adrenalina pode resultar em um aumento de glicogênio cardíaco, que provavelmente é secundário à ação do hormônio sobre o tecido adiposo com aumento dos ácidos graxos circulantes que são rapidamente utilizados como combustível pelo coração. Embora a captação da glicose possa estar diminuída, a glicose que chega ao coração é desviada preferencialmente para o glicogênio. *In vivo*, os ácidos graxos do tecido adiposo são captados pelo fígado e metabolizados através do ciclo Lynen. Os ácidos graxos finalmente ativam a reversão da via glicolítica. Isto faz com que o lactato seja convertido a glicose e glicogênio. Desse modo, apesar do efeito da epinefrina sobre a desintegração do glicogênio, no fígado, o glicogênio hepático pode frequentemente ser aumentado quando a substância é administrada *in vivo*.

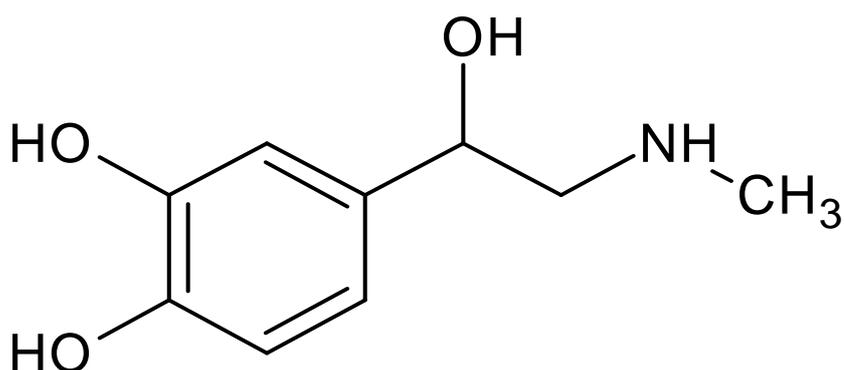


Figura 6- Estrutura química da adrenalina: 1,2-benzenodiol -4-(1-hidroxi -2-metilamina etil).

As principais indicações da adrenalina como medicamento são: alívio de broncoespasmo, em paradas cardíacas, em reações alérgicas graves e prolongar ação de anestésicos (SILVA, 2002).

O perfil farmacológico da adrenalina é relacionado à dose administrada e ligado à sua afinidade por receptores adrenérgicos – é um agonista dos receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos.

A estimulação dos receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , que estão presentes em todos os vasos sanguíneos ( $\alpha_1$  predominantemente nas artérias e  $\alpha_2$  predominantemente nas veias), produz vaso constrição. A estimulação dos receptores  $\beta$ , presentes nos vasos do coração ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ) e nos vasos dos músculos esqueléticos ( $\beta_2$ ), e nas artérias pulmonar, mesentérica superior e esplâncnica ( $\beta_2$ ), produz aumento das batidas do coração, taxa do coração e rendimento cardíaco, com conseqüente vasodilatação. Os efeitos da adrenalina na pressão sanguínea dependem de qual dos dois sistemas de receptores é predominante. Isso por sua vez é influenciado pela concentração de adrenalina no plasma, que depende do modo de administração e dose injetada (NEAL, 2003).

Baixas doses de adrenalina estimulam receptores  $\beta_2$  adrenérgicos ( $1$  a  $2 \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$ ) resultam em vasodilatação arterial, enquanto em doses moderadas ( $2$  a  $10 \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$ ) estimulam os receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , aumentando os efeitos inotrópicos e cronotrópicos. Doses moderadas também estimulam os receptores  $\alpha_2$ , aumentando o retorno venoso ao coração. Altas doses de adrenalina ( $>10 \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$ ) causam vaso constrição dos receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  (NIEMI, 2005; NEAL, 2003).

A epinefrina é metabolizada na circulação, sistema nervoso central, fígado e rim pela monoamina – oxidase (MAO) e catecol- (O) – metil – transferase (COMT). Uma vez exposta a essas enzimas, a meia vida da adrenalina é muito curta. Clinicamente, os efeitos de uma administração intravenosa de adrenalina durariam menos que 3 minutos, enquanto se utilizada uma infusão não intravascular este efeito dura de 40 a 120 minutos, dependendo de como o término do efeito é medido (NEAL, 2003).

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para a determinação de adrenalina em várias amostras. Estes incluem ensaios fluorimétricos e espectrofotométricos e métodos cromatográficos como cromatografia gasosa / espectrofotometria de massa e CLAE com detecção eletroquímica. Desses métodos, a CLAE é o mais usado. Extração preliminar e concentração são procedimentos necessários para medir as concentrações de adrenalina no plasma. O pré-tratamento mais comum envolve extração com alumina, com ou sem um passo de extração aniônica. Geralmente as

amostras são analisadas com cromatografia de fase reversa com reagentes de pareamento iônico; outros métodos usam coluna de troca catiônica para separar as aminas extraídas. Detecção eletroquímica, usando detecção amperométrica ou coulométrica, é a mais comum para quantificar adrenalina (ROSANO; WHITLEY, 2003).

Alguns exemplos de técnicas de detecção de adrenalina estão mostrados no Quadro 4.

Quadro 4 - Técnicas utilizadas na determinação de adrenalina e suas respectivas faixas lineares.

<b>Técnica</b>	<b>Faixa Linear</b>	<b>Autor</b>
Fluorimetria	$1,4 \times 10^{-9} - 2,1 \times 10^{-6}$ mol L <sup>-1</sup>	GUO et al. (2002)
Espectrofotometria	1-12 µg mL <sup>-1</sup>	MEDINA; DE CÓRDOVA; DIAZ (2000)
Voltametria cíclica	$1 \times 10^{-6} - 1,3 \times 10^{-4}$ M	LIU; HONMA. ZHOU (2005)
FIA com detecção fluorimétrica	0,05-15 e 20-40 mg L <sup>-1</sup>	TORRES ; ROMERO ; CALATAYUD (1998)
Eletroquimiluminescência	$2 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup>	LI; CUI; LIN (2002)
Biossensor potenciométrico	$3 \times 10^{-7} - 3 \times 10^{-1}$ mol L <sup>-1</sup>	MOREIRA; MAGALHÃES; LUCCAS (2005)
Biossensor amperométrico	$5 \times 10^{-5} - 3,5 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup>	FELIX; YAMASHITA; ANGNES (2006)
Biossensor voltamétrico	$2 \times 10^{-4} - 1,2 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup>	CARUSO; VIEIRA; FATIBELLO – FILHO (1999)
CLAE (detector de fluorescência)	0 – 270 nmol L <sup>-1</sup>	HANSEN et al. (1999)

## 1.8 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

Construir e caracterizar um minibiossensor empregando polifenoloxidase, capaz de determinar adrenalina em amostras de interesse farmacêutico tais como

medicamentos e fluidos biológicos. Visando este objetivo, várias variáveis foram estudadas: fonte de enzima; atividade enzimática, material e reagentes para a construção do biossensor e características analíticas em termos de seletividade, sensibilidade e exatidão.

Após a caracterização do biossensor, este foi avaliado para medidas em medicamentos e *in vivo*.

### 1.9 JUSTIFICATIVA

A principal técnica que tem sido empregada para determinação de adrenalina é a de CLAE o que se explica devido principalmente à sua excelente seletividade. Contudo, considerando o alto custo de implantação e operação desta técnica, a alternativa da determinação de adrenalina empregando biossensores é plausível.

Além disso, as dimensões do biossensor construído se mostram adequadas para a possível utilização deste dispositivo *in vivo*, o que possibilitaria a monitoração do analito de interesse dentro de um organismo.

A seletividade intrínseca do biossensor propiciada pela enzima e a rapidez das análises unidas ao baixo custo de construção e implantação justificam a pesquisa proposta.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Abaixo seguem equipamentos, reagentes e metodologias utilizadas no presente trabalho.

### 2.1 REAGENTES

- Epinefrina (Sigma<sup>®</sup>) utilizada como padrão e para determinação da atividade enzimática;
- Dihidrogenofosfato de potássio (Synth<sup>®</sup>) e hidróxido de sódio (Vetec<sup>®</sup>) utilizados na obtenção do tampão fosfato;
  - Polivinilpirrolidona (PVP) - Polyclar K-30 (Henrifarma<sup>®</sup>), utilizada como preservante do extrato bruto enzimático;
  - Poli (Cloroeto de Vinila) – PVC (Merck<sup>®</sup>), utilizado no isolamento da parede externa da agulha de aço inoxidável;
  - Grafite (Synth<sup>®</sup>), vaselina (Rioquímica<sup>®</sup>), acrílico auto polimerizante (B&B<sup>®</sup>), araldite<sup>®</sup>, cola de PVC (Akros<sup>®</sup>), e KCl (Merck<sup>®</sup>), utilizados no preparo da pasta de grafite;
  - Sulfato de cobre (Vetec<sup>®</sup>), tartarato de sódio e potássio (Mallinkrodt<sup>®</sup>), para preparo do reagente de Biureto;
  - Soroalbumina bovina (BSA), usado como padrão para quantificação de proteínas totais;
  - Ágar (Biotec<sup>®</sup>) usado para preparo do eletrodo referência (Ag/AgCl);
  - Norepinefrina (Fluka<sup>®</sup>), dopamina (Sigma<sup>®</sup>), ácido L-ascórbico (Vetec<sup>®</sup>), ácido úrico (Vetec<sup>®</sup>) e uréia (Vetec<sup>®</sup>), testados como interferentes;
  - Ácido nítrico (Merck<sup>®</sup>) utilizado para descontaminação das agulhas e da vidraria;
  - Tetrahidrofurano - THF (Vetec<sup>®</sup>) utilizado na polimerização do PVC;
  - Heparina (Bioclin<sup>®</sup>) utilizado como anticoagulante nas amostras de sangue;
  - Cloridrato de Ketamina (König<sup>®</sup>), utilizado para anestésiar os ratos.

## 2.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados no presente trabalho encontram-se no Laboratório de Análise Química de Fármacos da Universidade Federal de Alfenas.

- Espectrofotômetro –Shimadzu<sup>®</sup> UV 2401, utilizado na determinação da atividade enzimática;
- Par de cubetas de quartzo com 1 cm de passo ótico (Hellma).
- Potenciômetro - Micronal<sup>®</sup> modelo B 374, utilizado para detecção dos sinais potenciométricos;
- Centrífuga Excelsa Baby I – Fanem<sup>®</sup>, utilizada na preparação do extrato bruto enzimático;
- Agitador magnético – Fisatom<sup>®</sup>, utilizado nos testes em célula de 30 mL;
- Balança analítica - Sartorius<sup>®</sup> modelo BP 210S para pesagem dos reagentes;
- Amostrador automático descrito por FIGUEIREDO et al. (2006) para leitura dos padrões e amostras;
- Microsoft Excel<sup>®</sup> e Origin<sup>®</sup>, utilizado para tratamento dos dados;
- Eletrodo de referência de calomelano Analyser<sup>®</sup> utilizado nas medidas com biossensor de agulha;
- Fio de prata para confecção do eletrodo referência Ag/AgCl, retirado de eletrodo de vidro Analyser<sup>®</sup>;
- Interface modelo Lab PC com resolução de 12 bits (National instruments<sup>®</sup>).

### 2.2.1 Outros Materiais

- Liquidificador – ARNO<sup>®</sup> e gases (MedGauze<sup>®</sup>), utilizados no preparo do extrato bruto enzimático;
- Agulhas de aço inoxidável Ibras<sup>®</sup> e tubos de poetileno 0,4 mm e 0,8 mm d. i (Reyglass<sup>®</sup>), utilizados para a confecção dos minibiossensores.

### 2.3.1 Obtenção do extrato bruto enzimático (EBE)

Para obtenção do EBE de vários vegetais, fontes conhecidas de polifenol oxidase tais como: abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), mandioca (*Manihot sculenta*), batata (*Solanum tuberosum* L.), inhame (*Colocasia sp.*), berinjela (*Solanum melogena*), banana (*Musa sp.*).

O seguinte procedimento foi adotado: uma massa de 25,0 g do vegetal descascado foi picada e misturada com 100 mL de tampão fosfato 0,100 mol L<sup>-1</sup>, preparado utilizando-se fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e o pH 7,00 foi ajustado com hidróxido de sódio (NaOH). Ainda foram adicionadas 2,50 g de agente protetor polivinilpirrolidona (PVP) e o extrato foi processado em um liquidificador durante 3 min. A mistura foi filtrada em gaze dobrada em quatro e centrifugada a 5.000 rpm durante 30 min, a 25°C. A solução sobrenadante foi armazenada no refrigerador a 4°C e usada como fonte enzimática (ROSATTO et al., 2001; FATIBELLO FILHO; VIEIRA, 2002; FATIBELLO FILHO; LUPETTI; RAMOS, 2003; CARUSO; VIEIRA; FATIBELLO FILHO, 1999; SIGNORI; FATIBELLO, 1994).

O procedimento de obtenção do extrato está mostrado esquematicamente na figura 7.

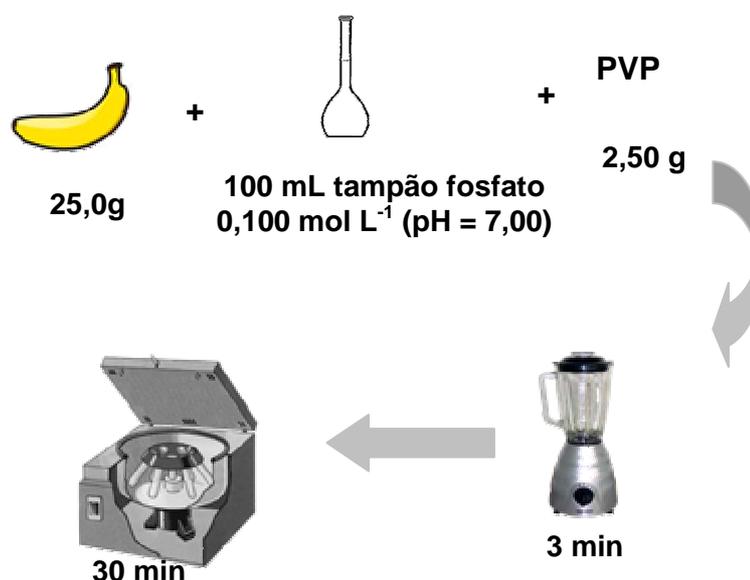


Figura 7: Esquema do procedimento de preparação do extrato bruto enzimático.

### 2.3.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade da PFO presente no EBE de vegetais foi determinada em triplicatas pela medida de absorbância em 410 nm, monitorando a formação da epinefrinoquinona (CARUSO; VIEIRA; FATIBELLO FILHO, 1999) conforme reação descrita na figura 8.

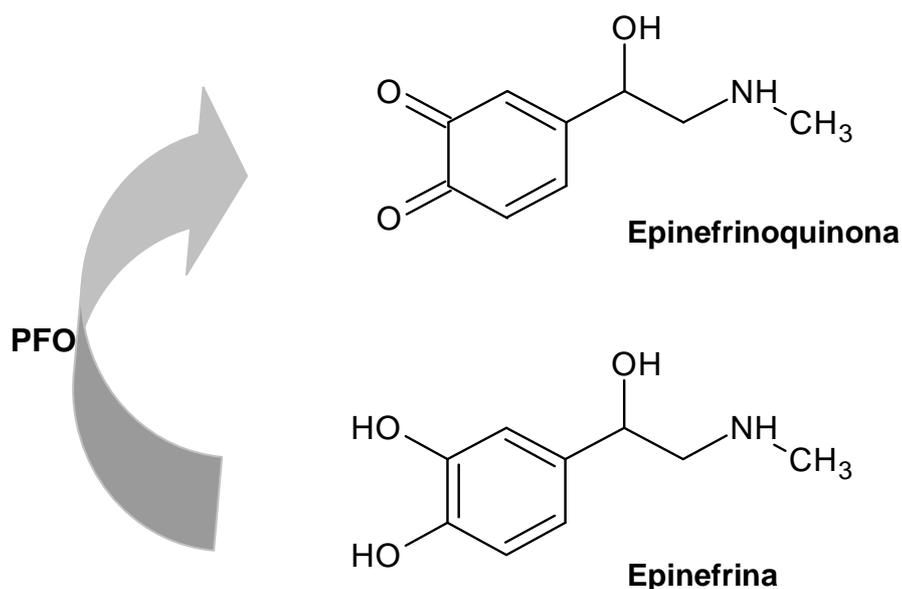


Figura 8 :Reação da epinefrina em presença de PFO, resultando na formação da epinefrinoquinona.

Mediu-se a velocidade de reação para as misturas reacionais contendo diferentes volumes de EBE de 0,05 a 0,20 mL, com incrementos de 0,05 mL , 2,40 mL de adrenalina  $5,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  e completa-se o volume com tampão fosfato  $0,100 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 7,00) para 3,00 mL em cubeta de quartzo. A atividade enzimática é numericamente igual ao coeficiente angular do gráfico da velocidade em função da quantidade de enzima multiplicado por mil (HARPER, 1973; MOREIRA; MAGALHÃES; LUCCAS, 2005).

O procedimento adotado está esquematicamente mostrado na figura 9.

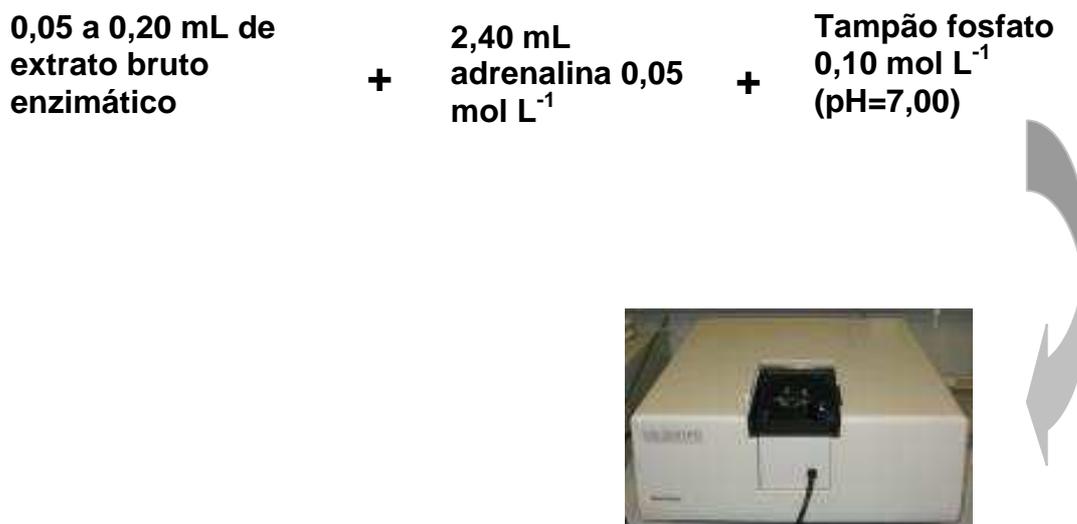


Figura 9 : Procedimento adotado para medidas de atividade enzimática.

### 2.3.3 Determinação da concentração de proteína total pelo método de Biureto

Com o intuito de se verificar a estabilidade das proteínas no extrato bruto enzimático e também calcular a atividade enzimática relativa, foram feitas determinações de proteínas totais no extrato bruto enzimático empregando o método de Biureto (SUMMER; MYRBÄCK, 1951).

A curva analítica foi preparada a partir de uma solução estoque de BSA de 1,000 g L<sup>-1</sup>. As concentrações estudadas foram de: 33,3 ; 100,0; 166,7; 233,3; 333,3; 400,0; 500,0 mg L<sup>-1</sup>. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro a 540 nm.

Para as medidas de proteína no extrato bruto a volumes de 50, 100 e 150 µL foram adicionado o reagente de Biureto, completou-se o volume para 6,0 mL e o tubo foi levado ao banho maria por 15 min e as leituras foram feitas em 540 nm.

### 2.3.4 Preparação do sensor

A construção dos eletrodos foi realizada de maneira semelhante à proposta por Abdel-Hamid; Atanasov e Wilkins(1995).

Uma agulha de aço inoxidável (calibre = 18) foi cortada em uma das terminações para remover a tampa de plástico, e a extremidade foi alisada usando lixa. A agulha foi mergulhada em ácido nítrico concentrado (ca. 10 segundos), lavada com água destilada e seca.

A pasta de grafite foi obtida misturando-se grafite em pó e volumes variáveis de PFO (foram testados biossensores contendo de 25 a 300 unidades de enzima) em um almofariz com pistilo, por 20 minutos. Em seguida foi misturada vaselina, por mais 20 minutos. Foi utilizada uma proporção de 75:25 % em massa de grafite e vaselina (VIEIRA, 2000). A pasta foi introduzida no interior da agulha de aço inoxidável ou tubo de polietileno (figura 10). Além da vaselina, outras substâncias foram testadas para a confecção do biossensor de agulha inoxidável, como mostra o quadro 5.

Quadro 5 : Substâncias utilizadas no preparo do biossensor.

<b>Substância</b>	<b>Proporção (m/m)</b>
Araldite®	75% grafite + 25% Araldite®
Cola PVC	75% grafite + 25% Cola PVC
KCl	75% grafite + 25% KCl
Acrílico auto - polimerizante	75% grafite + 25% Acrílico auto – polimerizante

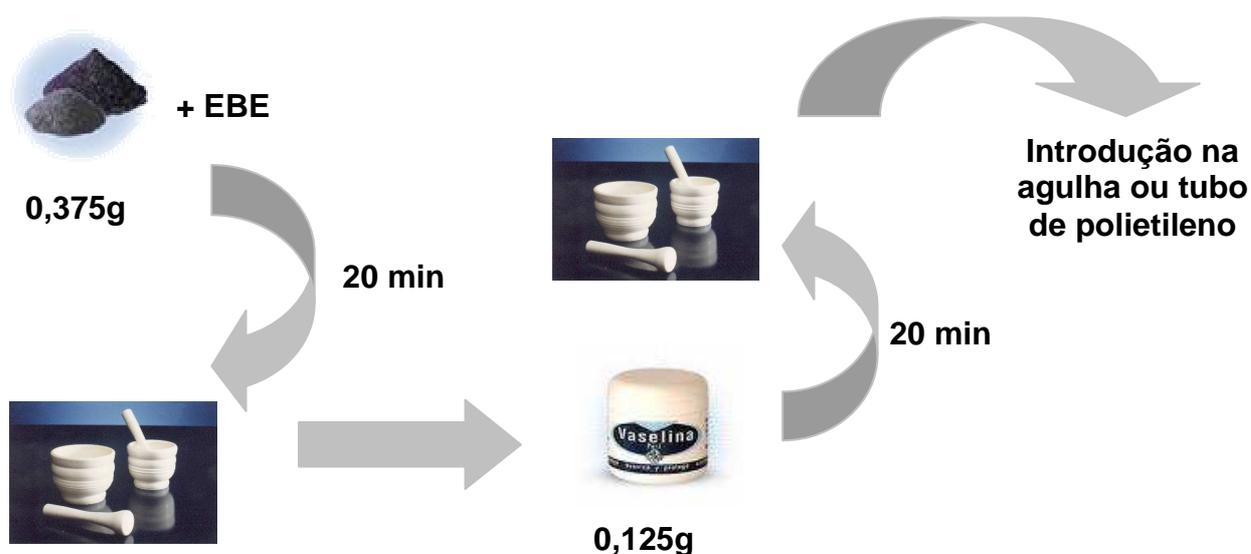


Figura 10 : Procedimento adotado para preparo da pasta de grafite.

O interior da agulha faz o contato elétrico com a membrana de pasta de grafite, e o exterior da agulha é isolado com um polímero PVC como mostra a figura 11.

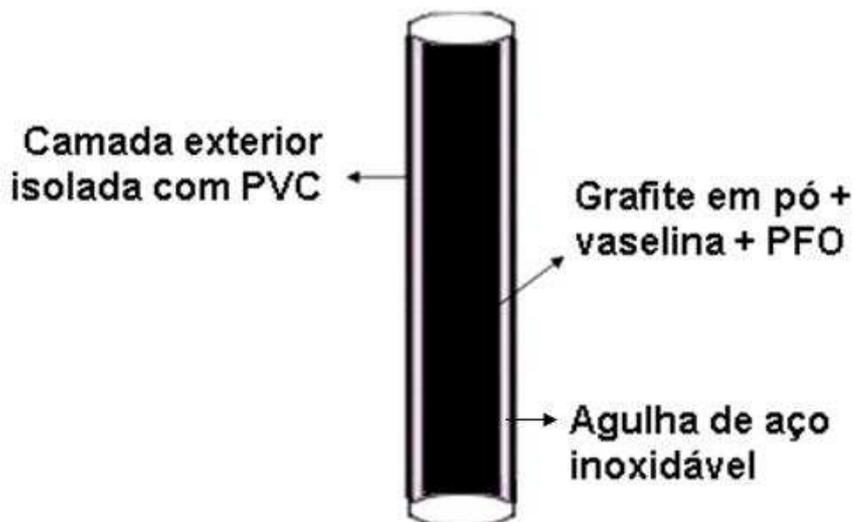


Figura 11 : Desenho esquemático do minibiossensor construído com agulha.

Para a construção dos sensores com tubos de polietileno de 0,4 e 0,8 mm de diâmetro interno, um fio de cobre foi utilizado para fazer o contato elétrico. Na figura 12 pode ser visto um dos biossensores construídos com tubo de polietileno. Os biossensores de diâmetros diferentes foram testados em duas concentrações:  $8,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e  $8,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .



Figura 12 : biossensor preparado com tubo de polietileno 0,4 mm d. i.

### 2.3.5 Preparo do eletrodo referência Ag/AgCl

Um tubo de polietileno de 0,40 mm d. i. foi preenchido com solução 3,00 mol L<sup>-1</sup> de KCl. Para a ponte salina foram preparados 20,00 mL de uma solução saturada de KCl e esta foi aquecida juntamente com 2,00 g de agar. Esta solução foi aspirada para dentro do tubo de polietileno para que a ponta ( $\pm 1$  cm) deste fosse preenchida com a solução (LI et al., 2000).

O fio de Ag/AgCl utilizado na construção do eletrodo de referência foi retirado de um eletrodo de vidro quebrado, considerando que as medidas de potencial foram computadas como a diferença entre o sinal da linha base e valor máximo, tem se, portanto que o valor absoluto do potencial do eletrodo de referência não influencia na exatidão das medidas.

### 2.3.6 Avaliação e caracterização do sensor

Os sensores primeiramente foram testados com soluções padrão de adrenalina ( $1,50 \times 10^{-3}$  a  $1,10 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> com incrementos de  $1,30 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) em uma célula (volume de 30 mL) agitada magneticamente. Um eletrodo comercial de calomelano foi empregado como eletrodo de referência.

A resposta do sensor foi testada frente a interferentes fisiológicos comuns (como norepinefrina, dopamina, ácido úrico, ácido L-ascórbico e uréia). Alíquotas de soluções desses interferentes foram introduzidas na célula de medida a fim de produzir concentrações próximas aos níveis fisiológicos dessas substâncias no sangue total (YANG; ATANASOV; WILKINS., 1999; ABDEL-HAMID; ATANASOV; WILKINS, 1995). A concentração de adrenalina foi mantida em  $8,00 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, sendo que todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato pH = 7,00. Todos os interferentes foram testados em três concentrações diferentes conforme segue:

Para ácido ascórbico, cuja concentração normal no sangue é de 0,600 mg/100 mL, foram testadas soluções de 0,100; 0,600 e 1,70 mg/100 mL.

Para o ácido úrico, cuja concentração normal no sangue é de  $70,0 \text{ mg L}^{-1}$ , foram testadas soluções de  $50,0$ ,  $70,0$  e  $140 \text{ mg L}^{-1}$ .

Quando a noradrenalina, que tem valor normal no sangue de  $1,70 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , foi testada as soluções foram de  $0,850$ ;  $1,70$  e  $3,40 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

Para o teste com uréia, que tem valor sanguíneo normal de  $40,0 \text{ mg L}^{-1}$ , as soluções eram de concentração  $14,0$ ,  $40,0$  e  $80,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

No teste com dopamina (concentração normal =  $30,0 \text{ ng L}^{-1}$ ) as soluções utilizadas foram  $15,0$ ,  $30,0$ ,  $60,0 \text{ ng L}^{-1}$ .

### 2.3.7 Amostras

**Amostras de medicamentos:** foram utilizadas ampolas de solução aquosa de adrenalina  $1,000 \text{ g L}^{-1}$  sem tratamento, realizando apenas diluição para balão de  $25 \text{ mL}$  em  $\text{HCl } 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . As amostras foram adquiridas na clínica odontológica da Universidade Federal de Alfenas.

Para validação, foram feitas comparações com o método descrito na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1977). Segundo este método, fazendo-se uma varredura no espectrofotômetro entre  $230$  e  $350 \text{ nm}$ , a epinefrina na presença de  $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HCl}$  apresenta absorção máxima em  $280 \text{ nm}$ .

Para a curva analítica foram utilizados padrões de  $8,00 \times 10^{-5}$ ;  $1,60 \times 10^{-4}$ ;  $2,40 \times 10^{-4}$ ;  $3,10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

**Amostras de sangue:** O sangue foi coletado utilizando-se duas gotas de solução de heparina (comercial), para cada cinco mL de amostra. As amostras foram diluídas 1:10 com soro fisiológico para o preparo dos padrões da curva analítica. As concentrações estipuladas para a curva analíticas (10 padrões) foram de  $8,00 \times 10^{-12}$  a  $8,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  com incrementos de uma deca de unidade.

**Medidas *in vivo*:** Para as medidas *in vivo*, foram utilizados 5 ratos machos da linhagem Wistar com idade entre 60 e 75 dias. O biossensor foi introduzido na veia jugular ou cavidade peritoneal (Figuras 13 e 14) do animal.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina para realização do procedimento cirúrgico. Este trabalho teve aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Alfenas (Anexo A).

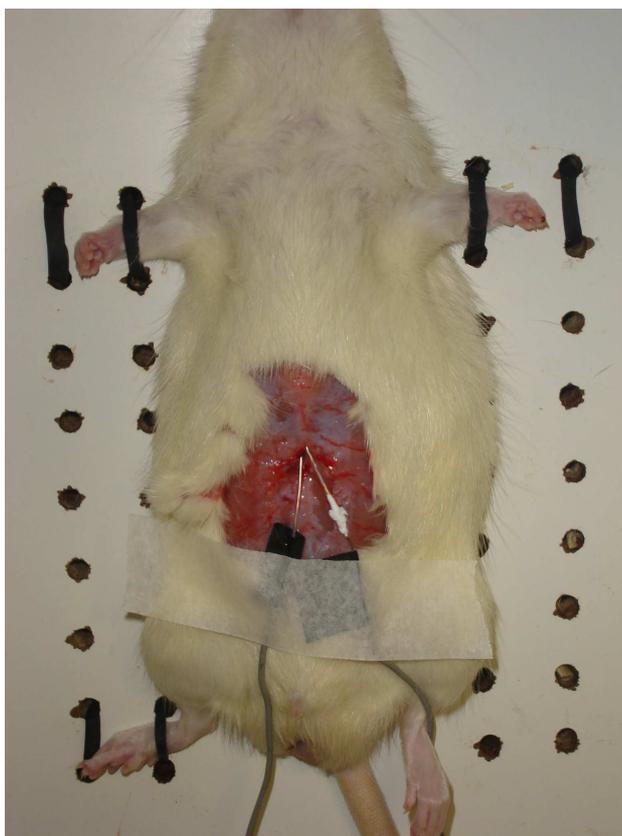


Figura 13 : Ratos utilizados para medidas *in vivo* com eletrodos inseridos na cavidade peritoneal.

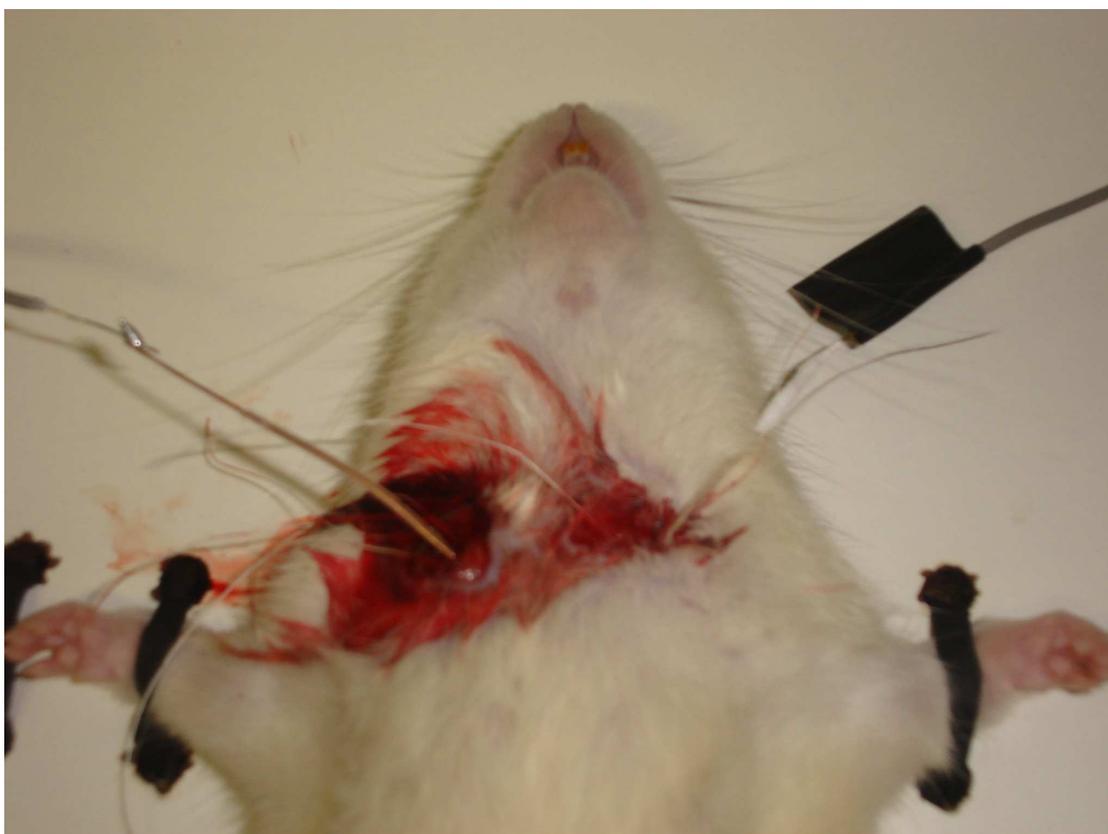


Figura 14 : Ratos utilizados para medidas *in vivo* com eletrodos inseridos na veia jugular.

Após implantação dos eletrodos no animal, cerca de 15 minutos foram necessários para estabilizar a linha base. Partindo-se do princípio de que ratos Wistar machos possuem aproximadamente 16,0 mL de sangue (BALASZCZUK et al., 2002), os cálculos foram feitos para que ao injetar 0,300 mL de uma solução de adrenalina  $6,56 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  a concentração final do analito no sangue fosse de  $1,23 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . A mudança do potencial do eletrodo implantado no animal foi monitorado.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Inicialmente foi obtido o extrato bruto enzimático de diferentes fontes conforme descrito no item 3.2 abaixo. Para o cálculo da atividade enzimática (UA) foi utilizada a técnica de medidas da velocidade da reação enzimática. A Figura 17 mostra as medidas em triplicata de 4 concentrações diferentes de extrato bruto enzimático de banana. As médias das medidas foram inseridas nas curvas apresentadas nas Figuras 15, 16, 17 e 18 cujos coeficientes angulares indicam o valor de UA do extrato.

As atividades enzimáticas também foram medidas através da fórmula abaixo e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

$$A \text{ (atividade)} = \Delta \text{ abs} \times 1000 / (\Delta T \times b \times V)$$

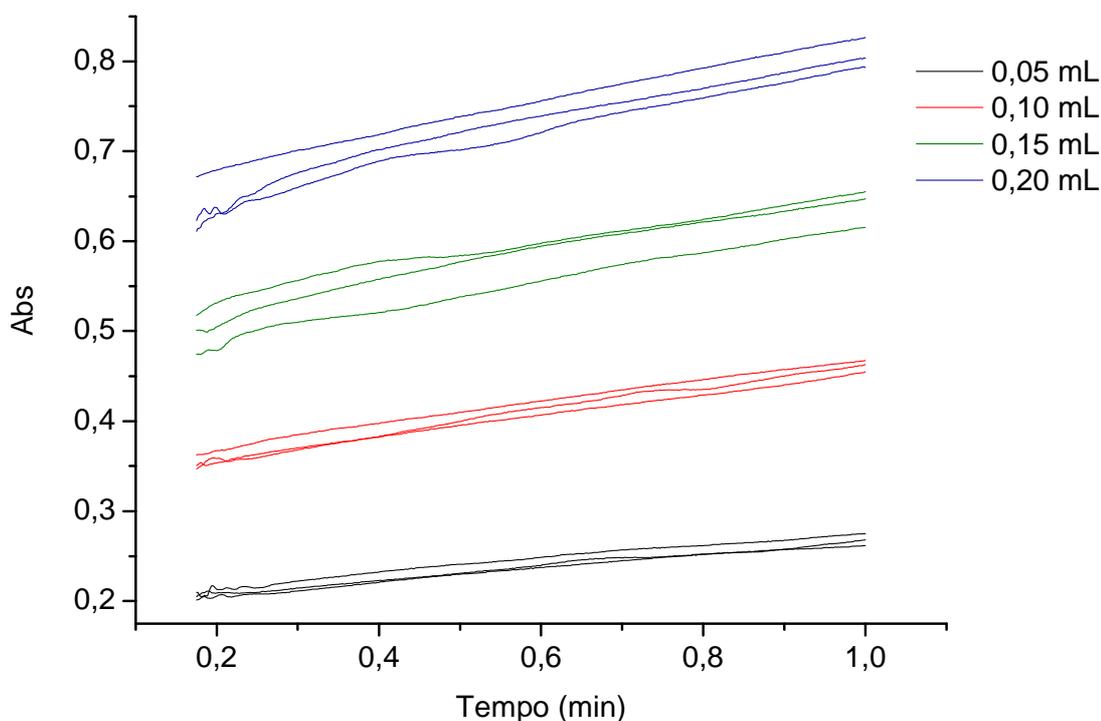


Figura 15 - Velocidade de reação para diferentes concentrações de extrato bruto de banana (*Musa sp.*).

Tabela 1 - Concentração de proteína; atividade calculada através da fórmula (F) e da curva de velocidade (C) seguidas de suas atividades específicas (AE) definidas como unidade por miligrama de proteína.

Dia	Proteína (mg mL <sup>-1</sup> )	Atividade da polifenol oxidase			
		F	AE <sub>F</sub> <sup>*</sup>	C	AE <sub>C</sub> <sup>*</sup>
1	16,81±0,61	952,8±27,5	56,93±6,75	1742±128,2	103,9±7,6
2	15,31±1,22	929,2±45,8	60,53±6,72	1985±67,68	129,6±4,4
3	16,04±0,89	897,9±10,1	55,98±4,89	2164±46,67	136,4±2,9
5	18,81±0,33	918,2±61,3	48,81±10,04	1376±103,2	73,13±5,5
6	18,13±0,57	864,0±37,8	47,66±9,03	2262±164,7	123,5±9,1

AE<sub>F</sub> = atividade específica calculada pela fórmula; AE<sub>C</sub> = Atividade específica calculada pela velocidade da reação.

Para a determinação de proteína total no extrato bruto (Tabela 1) foi empregado o método do Biureto. A curva analítica apresentou a seguinte equação ( $A = 0,0383C - 0,0285$ ,  $R^2 = 0,9959$ ). As concentrações de proteínas totais foram empregadas para o cálculo da atividade específica, a qual leva em consideração não apenas a atividade do extrato, mas também a concentração da enzima (Fatibello, Vieira, 2000) e assim tem-se uma representação mais adequada da atividade enzimática. Constatou-se que não houve uma degradação apreciável de proteínas durante o período estudado e, portanto as atividades e atividades específicas apresentaram perfis semelhantes em função do tempo.

### 3.2 ESTUDO DA FONTE ENZIMÁTICA

As medidas de atividades enzimáticas (conforme mencionado no item 3.1) foram feitas com extratos extraídos dos seguintes vegetais: berinjela, mandioca, inhame, abobrinha, batata doce, batata e banana, a fim de se obter a melhor fonte enzimática. Os resultados obtidos estão mostrados nas Figuras 16, 17 e 18.

Alguns dos vegetais utilizados não apresentaram bons resultados em relação à atividade enzimática, não pela ausência da enzima nestes, mas provavelmente pela velocidade com que esta reage, o que pode ser evidenciado na medição da atividade da berinjela (Figura 18b).

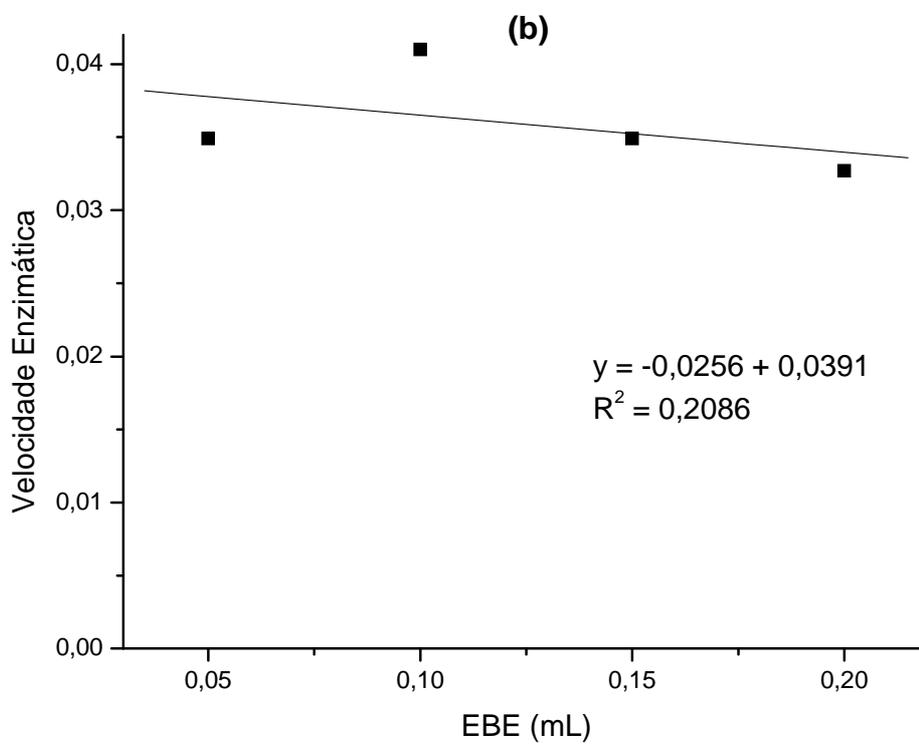
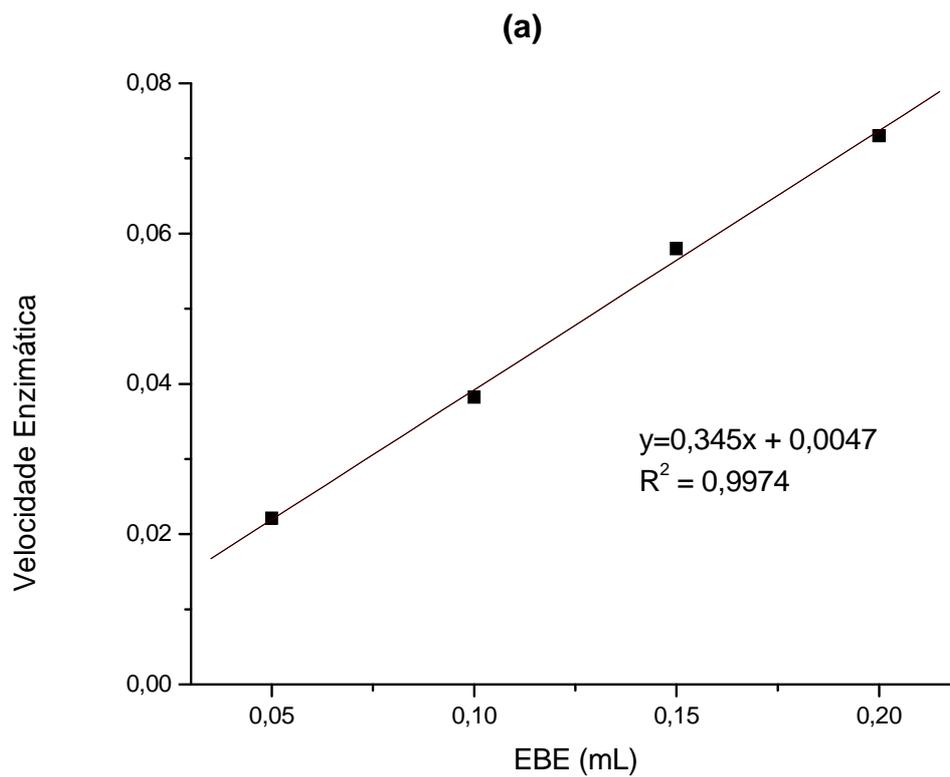


Figura 16 - Medidas da atividade enzimática de: a – abobrinha; b – batata doce .

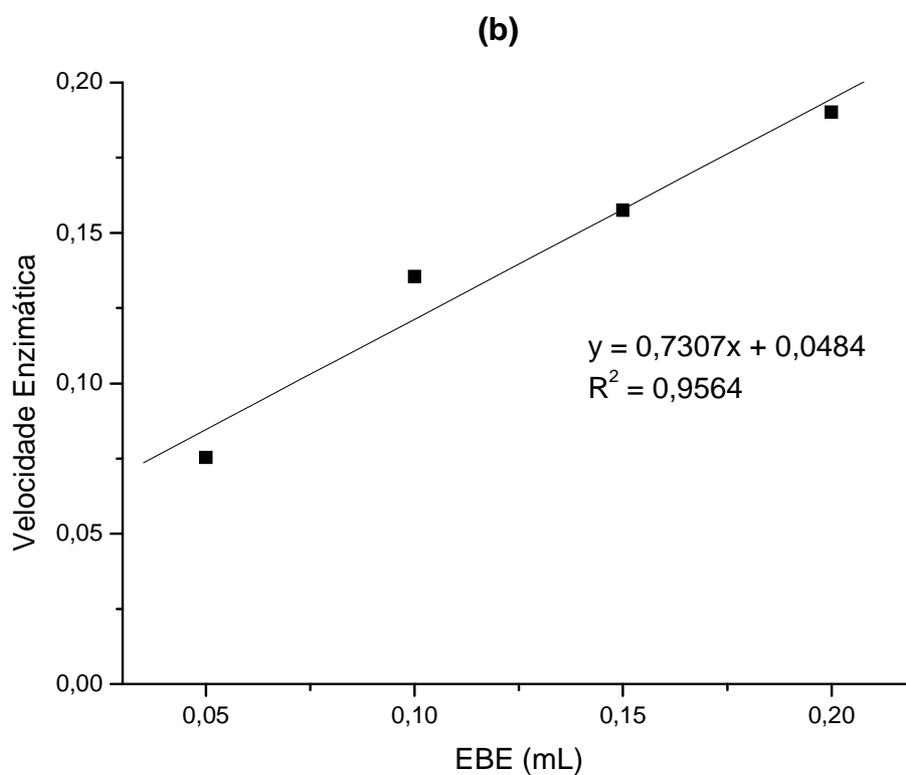
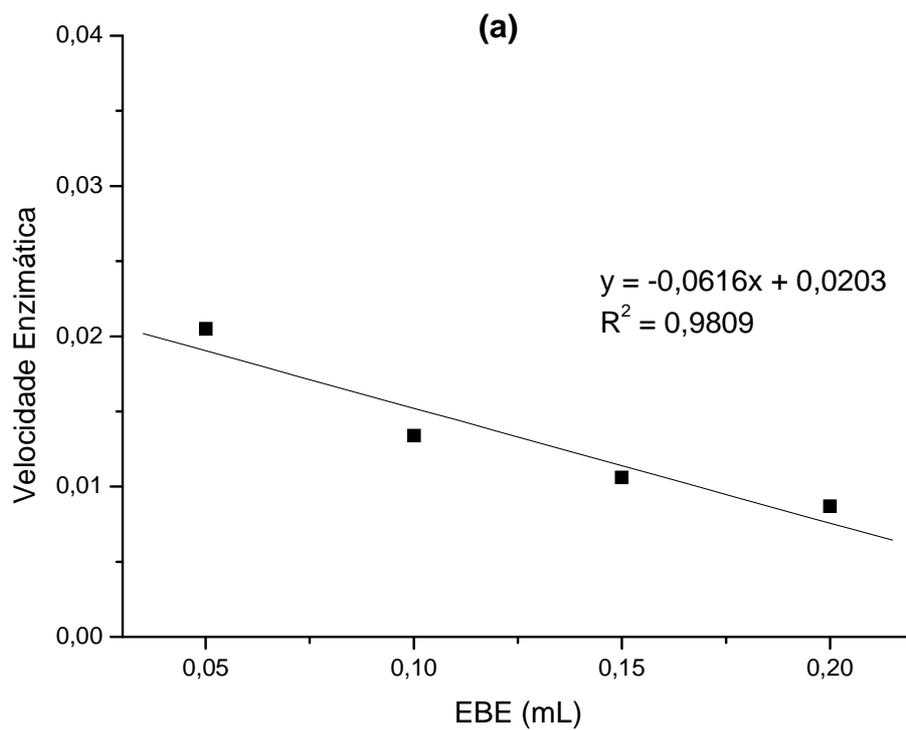


Figura 17 - Medidas da atividade enzimática de: a – mandioca; b – batata.

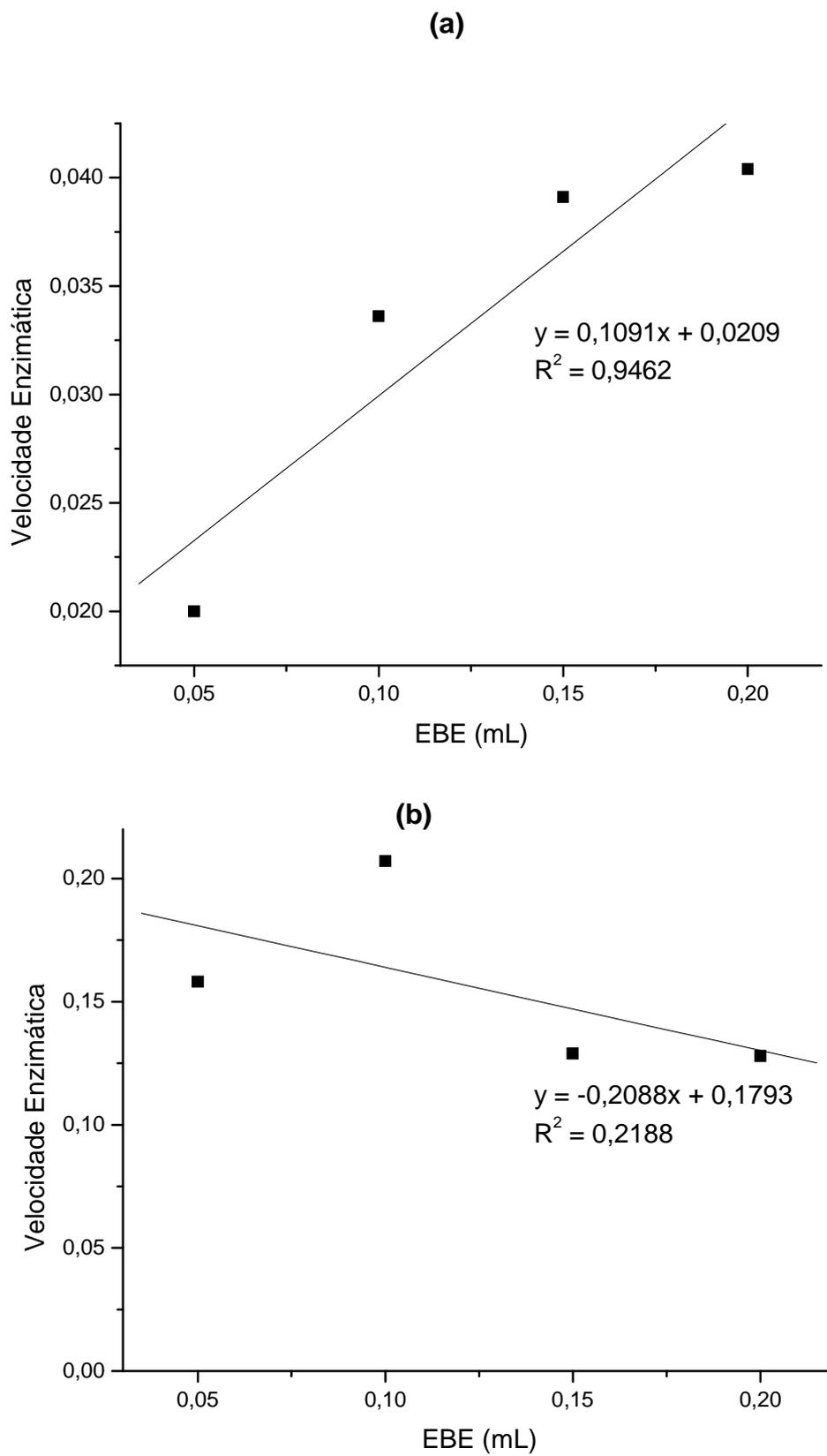


Figura 18 - Medidas da atividade enzimática de: a – inhame ; b – berinjela.

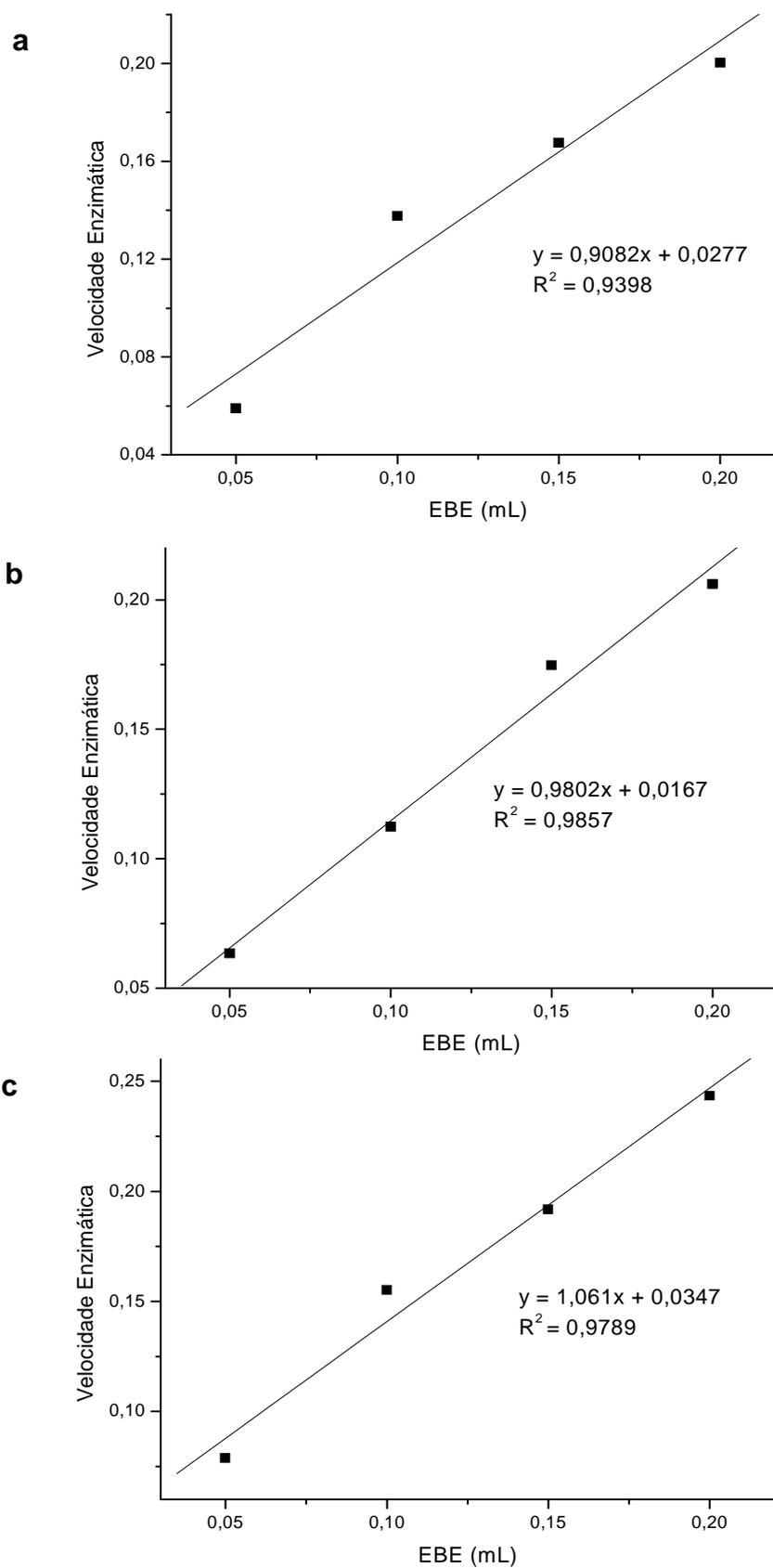


Figura 19 - Medida da atividade enzimática de banana: a – 1 dia após preparação; b – 4 dias após preparação; c – 8 dias após preparação.

Sendo a PFO uma família de enzimas (MAYER, 2006), os resultados diferentes obtidos para os vegetais são justificados pela possível presença de formas diferentes da enzima nos vegetais usados.

Os maiores valores foram obtidos com a medição da atividade da batata e da banana. Porém para a batata o mesmo extrato medido (Figura 17) em que a atividade calculada foi de 730 UA, após dois dias de preparação, mesmo com a utilização do conservante PVP que se liga a fenóis impedindo a reação destes com a PFO, como indica Rocha e Morais (2001), teve a atividade diminuída para 95 UA. A utilização da batata foi então descartada devido à instabilidade do extrato.

Os melhores resultados foram obtidos para a banana sendo que o extrato apresentou atividade durante pelo menos uma semana após a preparação (Figura 19). Utilizou-se então para a construção dos sensores, descritos a seguir, o extrato deste vegetal. Parte dos estudos sobre atividade de polifenoloxidase foi publicado na revista *Infarma*, v. 19, n. 9/10, p. 33-35, 2007 (APÊNDICE A).

### 3.3 CONSTRUÇÃO DOS SENSORES

Os primeiros minibiossensores foram construídos com agulha de aço inoxidável e PVC como isolante.

Foram testados: vaselina, cola de PVC, Araldite®, PVC, KCl e acrílico auto-polimerizante para compor a pasta de grafite. Como pode ser demonstrado pela Tabela 2, não foram obtidos sinais utilizando-se o Araldite®, o PVC, a cola de PVC e o KCl. Porém, os biossensores preparados com vaselina e acrílico auto-polimerizante geraram resposta para o analito.

Considerando os resultados mencionados para o biossensor montado com a agulha, optou-se pela utilização da pasta de grafite preparada com o acrílico devido ao maior sinal obtido com o mesmo.

Para os biossensores confeccionados utilizando os tubos de polietileno, a pasta de grafite introduzida foi a preparada com a vaselina que neste caso apresentou melhores resultados e maior facilidade de introdução do material.

Vale lembrar que foram feitos eletrodos controle (sem enzima) e esses não produziram sinais para adrenalina confirmando, portanto que a enzima PFO é a responsável pelo potencial formado.

Tabela 2 - Resposta de diferentes biossensores para solução:  $1,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de adrenalina em tampão fosfato pH=7,00.

<b>Substância</b>	<b>Resposta do sensor</b>
Cola de PVC	Não houve resposta
Araldite®	Não houve resposta
PVC	Não houve resposta
KCl	Não houve resposta
Vaselina	80 mV
Acrílico auto-polimerizante	150 mV

Na Figura 20 estão apresentadas as medidas feitas utilizando-se um sensor de acrílico auto-polimerizante e 50 unidades de enzima construído com agulha de aço inoxidável. O procedimento para as medidas consistiu em introduzir o eletrodo na célula de medida e efetuar adições sucessivas de quantidades constantes de adrenalina resultando em concentrações de  $1,50 \times 10^{-3}$  a  $1,10 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  com incrementos de  $1,30 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Foi observado um efeito de memória, i.e., o sinal do eletrodo não retorna à linha base quando inserido em solução branco isso pode ser atribuído à possível adsorção do analito na superfície do eletrodo. Contudo, houve boa linearidade computando as diferenças de potenciais medidos antes e após a introdução do eletrodo na solução.

Com o intuito de restabelecer a linha base foi empregada solução de peróxido de hidrogênio ( $0,163 \text{ mol L}^{-1}$ ) em tampão pH = 7,00. Os resultados obtidos com o emprego de peróxido de hidrogênio foram satisfatórios, i.e., houve retorno à linha base em aproximadamente 10 minutos. Isso ocorre provavelmente devido a oxidação da enzima e dessorção da adrenalina na superfície do eletrodo.

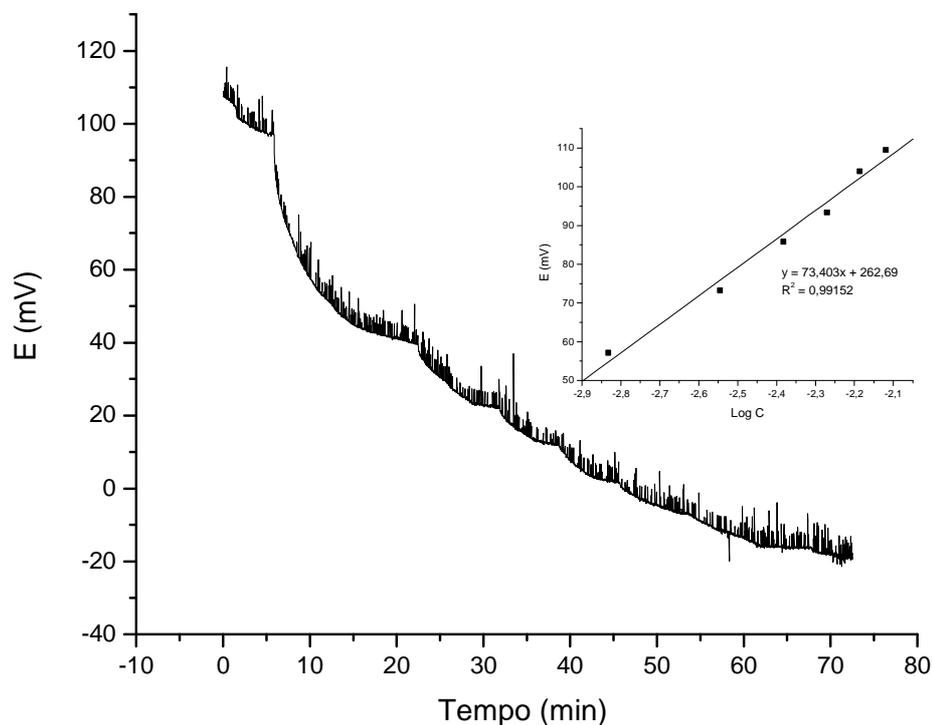


Figura 20 - Resultados obtidos para o biossensor de agulha com EBE de banana com 50 unidades de enzima (em agulha). Curva obtida com concentrações entre  $1,50 \times 10^{-3}$  e  $1,10 \times 10^{-2}$  mol  $L^{-1}$ , incrementos de  $1,30 \times 10^{-3}$  mol  $L^{-1}$ .

O eletrodo construído com tubo de polietileno apresentou parâmetros analíticos mais adequados para a aplicação pretendida e também uma maior facilidade na construção, uma vez que dispensa o uso de isolamento com membrana de PVC. Assim os demais experimentos foram feitos com eletrodos construídos com tubos de polietileno.

### 3.4 BIOSSENSORES UTILIZANDO TUBOS DE POLIETILENO

O polietileno por sua natureza não condutora dispensa o uso do PVC para formação de uma camada de isolamento. Para os experimentos utilizando esse tipo de eletrodo, as medidas foram realizadas utilizando o amostrador automático descrito por Figueiredo et al. (2006).

Nos estudos da influência da quantidade de enzima, como pode ser visto na Figura 21, o que apresentou melhores resultados foi o de 50 unidades, mesmo valor encontrado por Moreira, Magalhães e Luccas (2005) utilizando como fonte enzimática o inhame.

Foram testados tampões fosfato com pHs entre 6,0 e 8,0 (Figura 22), devido à proximidade do pH sanguíneo. O pH escolhido para o tampão nos experimentos *in vitro* foi de 7,00.

O pH ótimo para a enzima PFO é dependente da fonte da enzima e do substrato utilizado. Ünal, M. Ü. (2007), trabalhando com banana (*Musa cavendishii*) como fonte enzimática e catecol como substrato, encontrou 2 pHs ótimos: 5,50 e 7,00.

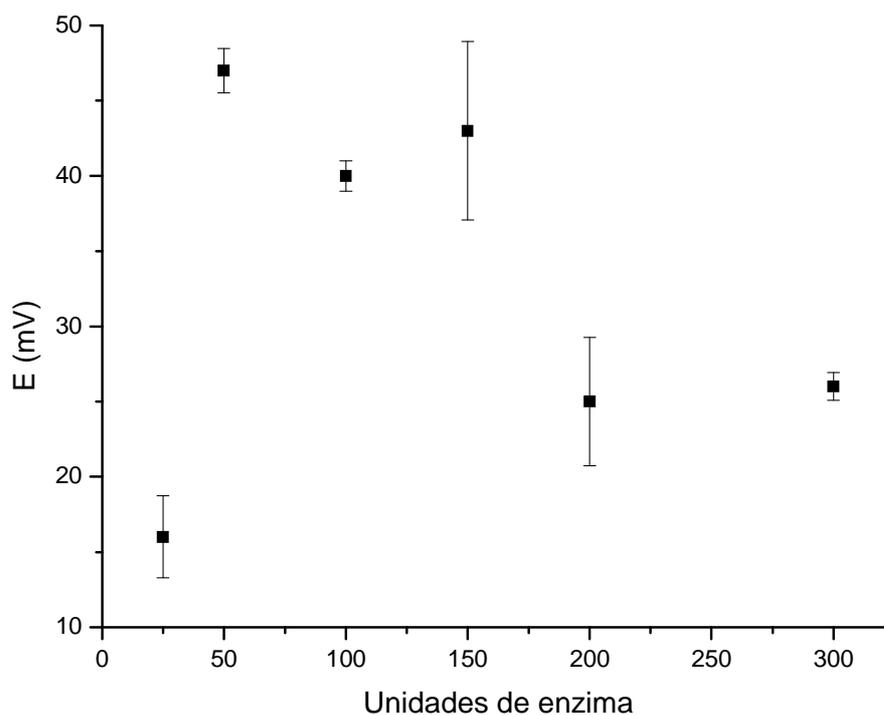


Figura 21 - Estudo da influência da concentração de PFO na construção de biossensores. Sinais obtidos para solução de adrenalina  $8,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato pH=7,00. As barras representam os desvios relativos para medidas em triplicata.

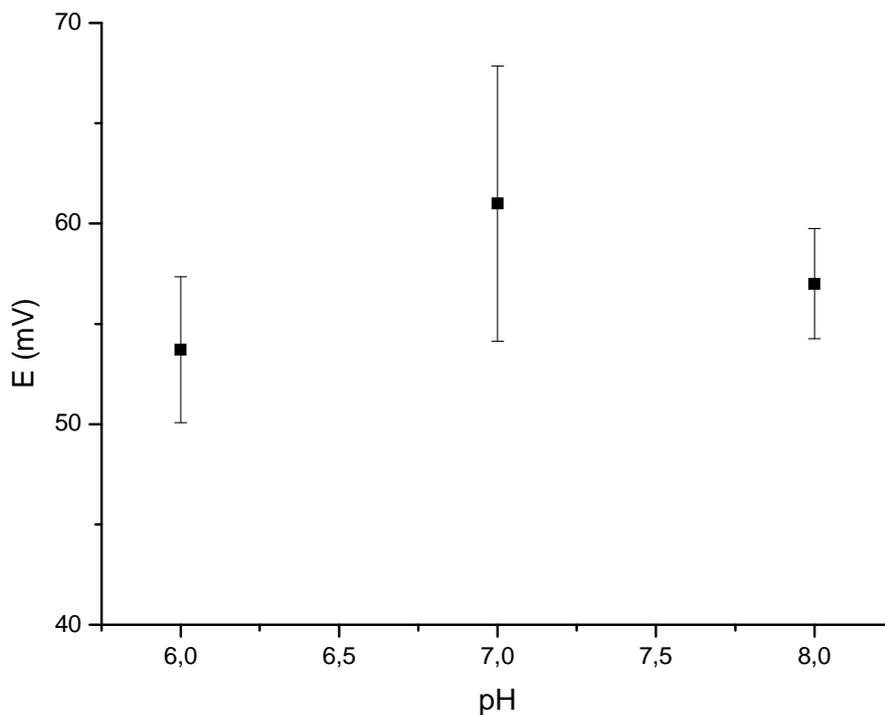


Figura 22 - Influência do pH na resposta do biossensor, soluções aquosas de adrenalina ( $8,00 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato. As barras representam os desvios relativos para leituras em triplicatas.

Com relação ao diâmetro, os testes foram feitos com tubos de 0,4 e 0,8 mm d.i., com biossensores construídos utilizando-se a mesma pasta de grafite.

Pode-se verificar observando a Figura 23 que os melhores resultados foram obtidos com o biossensor de 0,8 mm d. i. Porém, como o intuito final do trabalho foi o teste *in vivo* em ratos, o eletrodo escolhido para realização de experimentos posteriores foi o de 0,4 mm d. i. devido ao calibre da veia jugular do animal.

Para experimentos com animais de maior porte (portanto veias de maior calibre), o uso do eletrodo de 0,8 mm d. i. deve ser considerado.

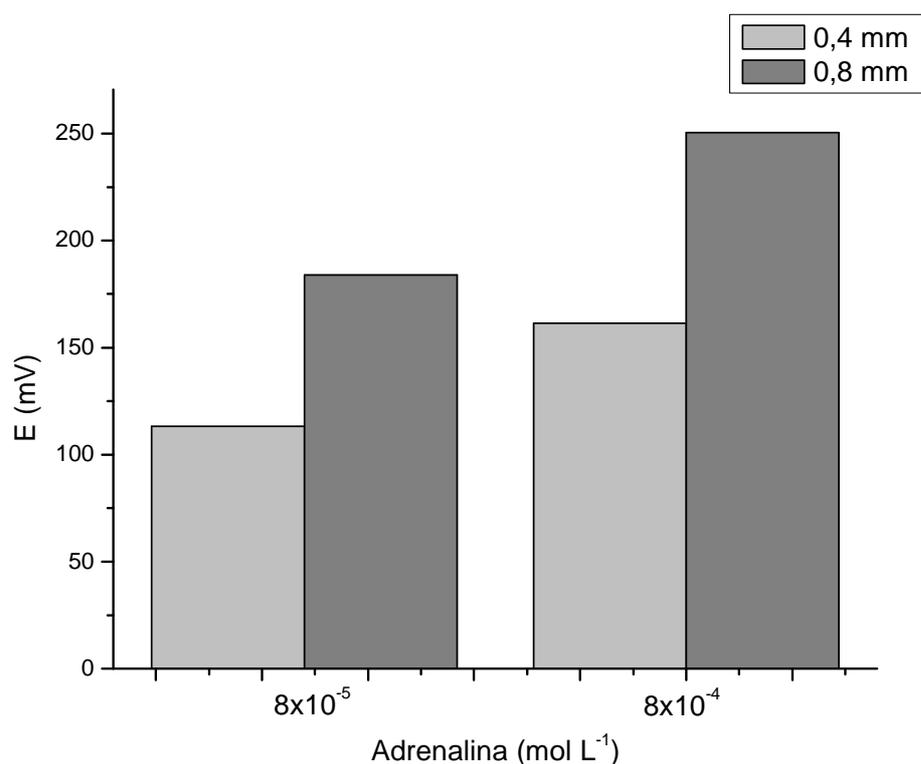


Figura 23 - Biossensores construídos com tubos de polietileno de calibres diferentes para terminações de  $8,00 \times 10^{-5}$  e  $8,00 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de adrenalina.

Nos estudos do tempo de resposta para o sensor de polietileno, também foi observado adsorção do analito no biossensor o que dificultou o retorno à linha base, assim se fez necessária a utilização de peróxido de hidrogênio. As Figuras 24a e 24b apresentam leituras em triplicata de um padrão de adrenalina ( $8,00 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) preparado em tampão fosfato e em amostra de sangue respectivamente com um tempo de leitura de 20 minutos em cada solução.

Após otimização, foi fixado, no amostrador automático os tempos de 10 minutos para a leitura do sinal do biossensor e 10 minutos para o retorno à linha base, com essa temporização obteve-se boa precisão das medidas (0,94 % de coeficiente de variação, n=10) e maior frequência analítica.

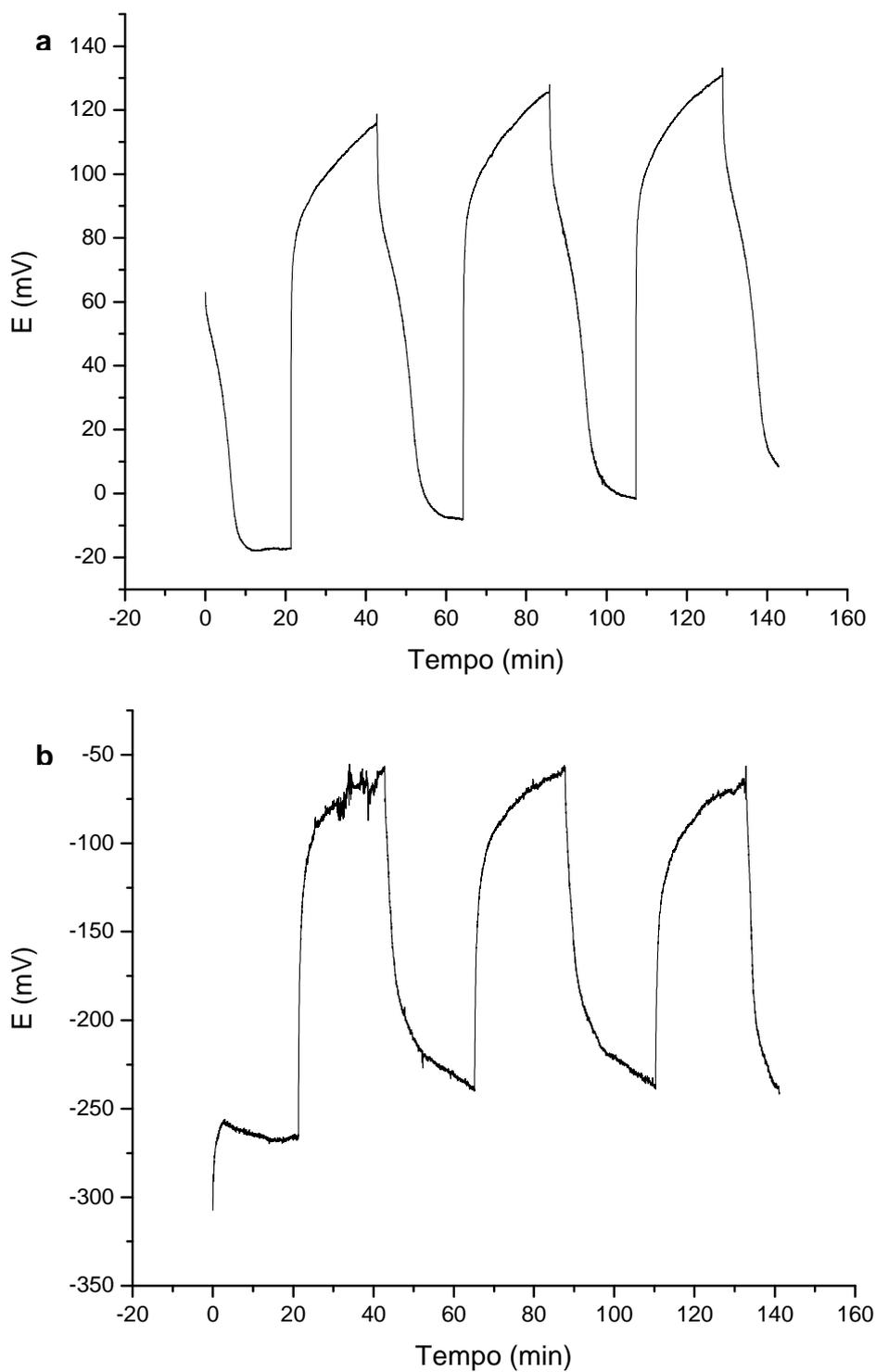


Figura 24 - Leitura de amostras de adrenalina  $8,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em: a – tampão fosfato pH=7,00; b- amostra de sangue.

### 3.5 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS – BIOSSENSOR DE POLIETILENO (D.I. 0,4 MM)

A Figura 25 apresenta a curva analítica de adrenalina em tampão fosfato pH = 7,00. O LD obtido foi de  $8,00 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> e a faixa de resposta linear foi de  $8,00 \times 10^{-9}$  a  $8,00 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>.

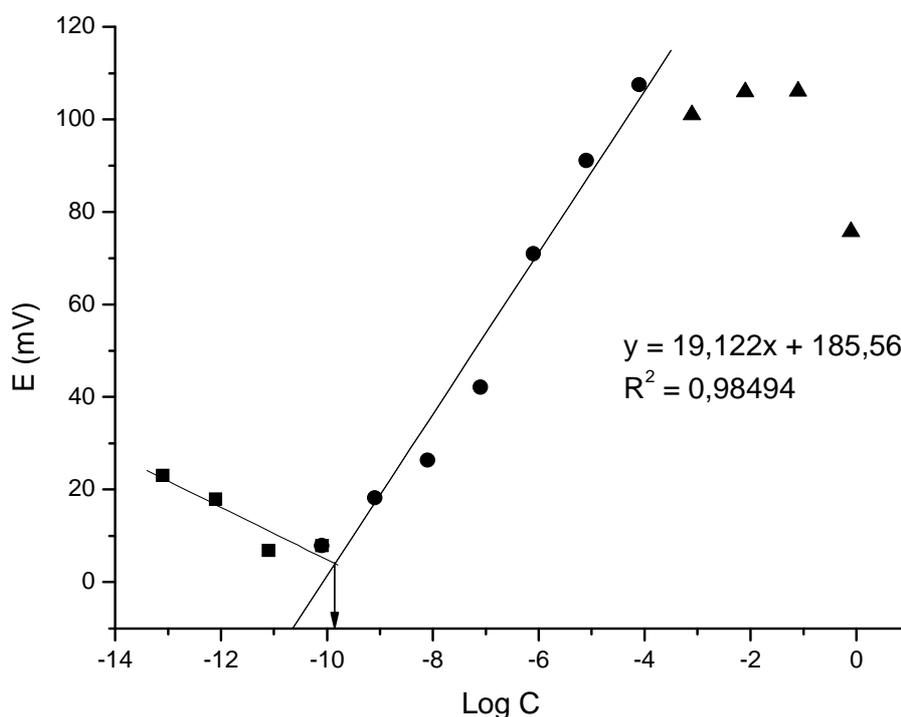


Figura 25 - Curva analítica obtida para biossensor de polietileno em tampão fosfato.

O eletrodo mostra-se, portanto mais sensível do que eletrodos já mencionados na literatura (Quadro 6).

A Figura 26 apresenta a curva analítica de adrenalina em amostras de sangue. Considerando que a amostra empregada nesse estudo apresentou concentrações de adrenalina não detectável, a mesma pode ser utilizada para uma calibração do tipo compatibilização de matriz. Assim, o LD obtido foi de  $8,00 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> e a faixa de resposta linear foi de  $8,00 \times 10^{-7}$  a  $8,00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Os coeficientes de variação das medidas em amostras aquosas e de sangue sempre foram inferiores a 0,94% e 7,42% respectivamente, indicando a boa precisão das medidas.

Quadro 6 - Eletrodos para determinação de adrenalina.

<b>Autores</b>	<b>LD (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Faixa linear (mol L<sup>-1</sup>)</b>
Moreira, L. N.; Magalhães, C. S.; Luccas, P. O. (2005)	$1,13 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-5}$ a $3,00 \times 10^{-2}$
Caruso, C. S.; Vieira, I. C.; Fatibello, O. (1999)	$8,20 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-4}$ a $1,20 \times 10^{-3}$
Felix, F. S.; Yamashita, M.; Angnes, L. (2006)	$1,50 \times 10^{-5}$	$5,00 \times 10^{-5}$ a $3,40 \times 10^{-4}$
Este trabalho	$8,00 \times 10^{-9}$	$8,00 \times 10^{-9}$ a $8,00 \times 10^{-4}$

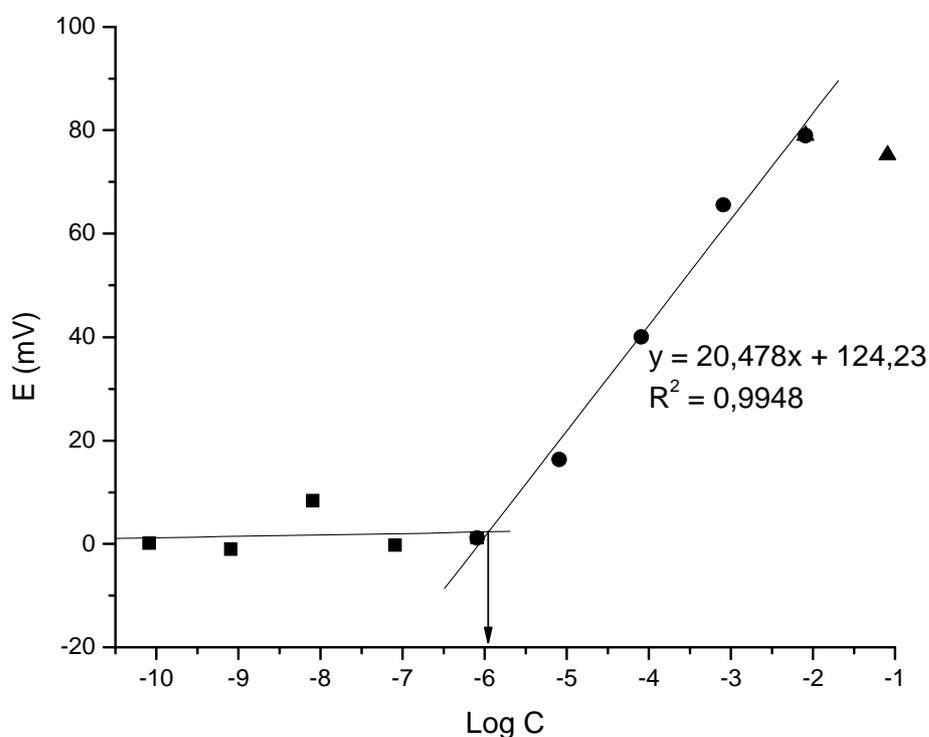


Figura 26 - Curva analítica obtida para biossensor de polietileno em sangue.

Outro fato importante foi a semelhança entre as sensibilidades obtidas em soluções aquosas e amostra de sangue, 19,122 e 20,478 mV/deca, respectivamente, o que indica que o eletrodo não é susceptível a interferência da matriz. Considerando que a reação de oxidação da adrenalina intermediada por PFO envolve dois elétrons nota-se que a resposta do biossensor caracteriza-se como sub-Nernstiniana.

### 3.6 ESTUDO DE INTERFERENTES

Foram testados os seguintes interferentes: ácido úrico, uréia, ácido ascórbico, noradrenalina e dopamina. Para os testes, a quantidade de adrenalina mantida durante todo o experimento foi de  $8,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Todos os interferentes foram estudados em três concentrações conforme descrito no item 2.3.6.

As interferências mais severas foram observadas para o ácido ascórbico. Esse composto provavelmente interage com a enzima PFO provocando redução da mesma e alterando o sinal analítico. Problemas com ácido ascórbico também foram encontrados em trabalhos com biossensores desenvolvidos por outros pesquisadores: No trabalho desenvolvido por Abdel-Hamid, Atanasov, Wilkins (1995) observou-se uma resposta relativa de 30% para ácido ascórbico para um biossensor desenvolvido para glicose; também para medida de glicose no cérebro (GEORGANOUPOLOU et al., 2000) a resposta do biossensor foi diminuída em até 30%, essa interferência foi considerada baixa pelos autores. Em ambos os trabalhos não se fazem inferências sobre o mecanismo de atuação do interferente.

Cabe lembrar que as concentrações que causaram maior interferência, para o ácido ascórbico, no presente trabalho, consistem de concentrações altas e diferentes das que são normalmente encontradas no sangue, a concentração (2) fisiológica (0,60 mg/100mL) apresentou interferência desprezível (2,22 %).

De modo geral, considerando a concentração geralmente encontrada nas amostras de sangue (conc. 2-Tabela 3), as interferências não foram severas, com exceção da noradrenalina e uréia, sendo possível corrigi-las empregando calibração por compatibilização de matriz ou adições de padrão (item 3.7).

Tabela 3 - Estudo de interferentes para solução  $8,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de adrenalina.

<b>Interferente</b>	<b>Conc. 01</b>	<b>Conc. 02</b>	<b>Conc. 03</b>
Ácido Ascórbico	+ 24,97%	+ 2,22%	+ 113,40%
Noradrenalina	- 20,04%	- 20,37%	+ 8,20%
Uréia	- 18,66%	- 17,87%	- 29,20%
Ácido Úrico	- 2,02%	- 3,81%	- 0,90%
Dopamina	+ 5,67%	- 5,82%	- 8,90%

### 3.7 AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO

Para se avaliar a exatidão das medidas foi empregada comparação com o método espectrofotométrico proposto na farmacopéia (FARMACOPÉIA, 1977), no caso de amostras de medicamentos, e testes de adição e recuperação para amostras de sangue.

A curva analítica para soluções aquosas de adrenalina em tampão fosfato pH = 7,00 em espectrofotômetro (Figura 27) apresentou boa linearidade na faixa de concentração estudada.

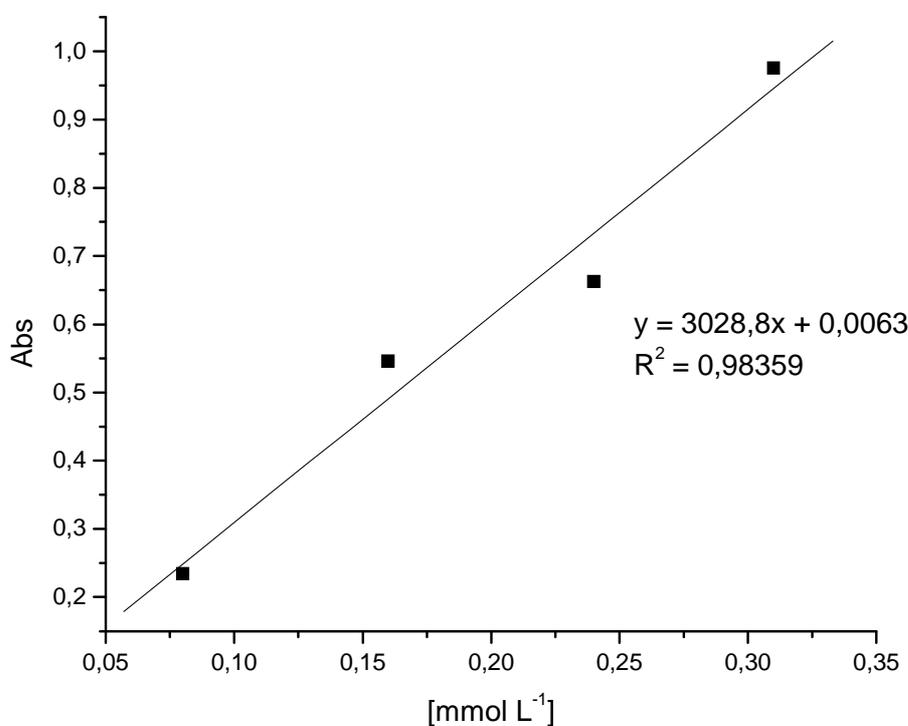


Figura 27 - Curva analítica de adrenalina, comprimento de onda: 280 nm.

Devido à dificuldade para conseguir as amostras de medicamento, já que é vendida somente em farmácias hospitalares, a comparação foi feita em apenas uma amostra de medicamento. Os resultados estão mostrados na Tabela 4. A precisão das medidas em ambos os métodos foram semelhantes (test-F) e os resultados obtidos foram aprovados no teste-t com 95% de confiança.

Tabela 4 - Determinação de adrenalina por espectrofotometria UV e biossensor potenciométrico.

<b>Amostra</b>	<b>Valor rotulado (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Farmacopéia (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Biossensor (g L<sup>-1</sup>)</b>
1	1,000	1,065 ± 0,001	1,026 ± 0,002
2	1,000	Não determinado	0,920±0,230
3	1,000	Não determinado	1,190±0,145

Para verificar a exatidão das medidas em amostra de sangue, adicionou-se  $2,73 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de adrenalina a uma amostra e o valor recuperado foi de  $2,44 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , ou seja, 89,4%. O cálculo da concentração foi feito empregando a calibração por compatibilização de matriz. Cabe mencionar que também a quantidade de amostras de sangue foram limitadas uma vez que para o presente trabalho utilizou-se apenas cinco animais para as medidas *in vivo* e *in situ*.

### 3.8 MEDIDAS *IN VIVO*

Como mencionado nos Materiais e Métodos (item 3.8), foram utilizados 5 ratos machos, da linhagem Wistar, com aproximadamente 350g.

Em dois dos ratos utilizados os eletrodos foram inseridos na cavidade peritoneal (Figura 13), enquanto que os eletrodos foram inseridos nas veias jugulares (Figura 14) dos três ratos restantes. O tempo para a realização do procedimento cirúrgico e obter os sinais era de aproximadamente 2 h (duração do tipo de anestesia aplicada). Antes que o animal recobrasse os sentidos, este era sacrificado por aprofundamento da anestesia utilizando éter.

Nos animais em que o sensor foi inserido na cavidade peritoneal, não houve resposta quando adrenalina foi injetada na corrente sanguínea do animal. Chegou-se a conclusão que não há irrigação suficiente na região para que a adrenalina injetada entre em contato com o sensor em quantidades suficientes para ser detectada por este.

Quando os biossensores foram inseridos na veia jugular dos animais (Figura 14) obtiveram-se os sinais que estão apresentados na Figura 28. Não foi possível esperar a estabilização da linha base devido ao tempo de anestesia do animal.

Contudo o tempo de resposta do eletrodo foi de aproximadamente quatro minutos. Nos experimentos, foram injetadas quantidades de adrenalina que conferiam uma concentração na circulação do animal de cerca de  $1,23 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , esse valor foi calculado considerando o volume médio de sangue de um animal (16 mL).

O primeiro sinal obtido foi de 20,5 mV, diminuindo para as injeções posteriores da mesma concentração de adrenalina ( sinal 2: 9,47 mV; sinal 3: 4,87 mV). As concentrações de adrenalina calculadas com a curva analítica por compatibilização de matriz (Figura 24) foram de  $8,63 \times 10^{-6}$ ,  $2,49 \times 10^{-6}$ ,  $1,48 \times 10^{-6}$ , para os sinais 1, 2 e 3 respectivamente, sendo portanto da mesma ordem de grandeza que a concentração injetada. Assim, considerando a complexidade da amostra e do experimento os resultados foram promissores. A diminuição da concentração obtida nas injeções sucessivas de adrenalina pode estar relacionada com a metabolização desse composto no animal.

Pode se notar também (Figura 28), que houve retorno a linha base, i.e., não houve adsorção de adrenalina, como ocorreu em soluções aquosas e medidas *in vitro*, esse fato pode ser atribuído a presença de oxigênio dissolvido na circulação do animal que confere um caráter oxidante semelhante ao do peróxido de hidrogênio. Outro fato importante é a rápida metabolização da adrenalina na circulação do animal o que diminuiu sua concentração provavelmente em menos de dois minutos.

Para a determinação de adrenalina *in vivo* não foram encontrados trabalhos na literatura. Mostra-se, porém importante para a verificação do aumento da concentração do analito durante intervenções cirúrgicas, o que pode ser indicativo de parada cardíaca.

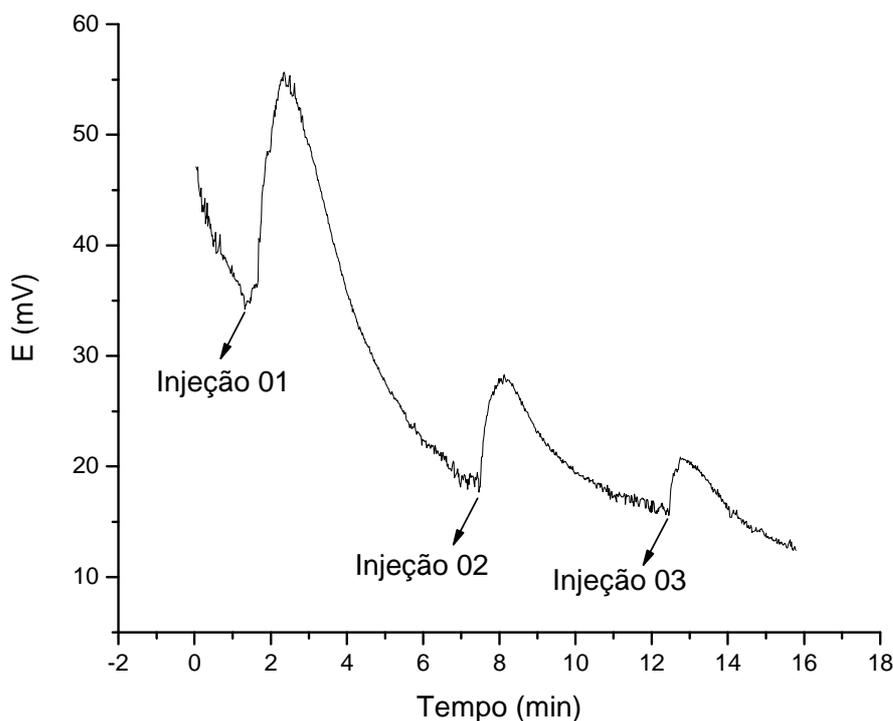


Figura 28 - Registros de medidas *in vivo* de adrenalina. As injeções consistem de 0,300 mL de adrenalina  $6,56 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

Para efeito de comparação pode-se mencionar algumas medidas *in vivo* com outros sensores:

Para a determinação de catecolaminas, pode se mencionar o trabalho de Earl et al., (1998), em que se implantaram os eletrodos, para medidas voltamétricas, no cérebro de sagüis, embora os animais utilizados possuíssem porte parecido com o dos ratos utilizados no presente trabalho, a preparação envolvendo a utilização dos animais foi maior, tal como submetê-los a ciclos de claro/escuro. Os resultados mostraram que a voltametria cíclica, neste caso, foi incapaz de detectar o analito em concentrações inferiores a  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  e, portanto, não pode ser usada para monitoração da dopamina na ausência de um estímulo que aumente a concentração desta.

Pesquisas com biossensores para lactato inseridos em tecidos musculares (WU et al., 2000) de camundongos, que são de fácil inserção pois foram confeccionados com agulhas de acupuntura, mostraram resultados satisfatórios indicando aumento na concentração de ácido láctico em 15% após o animal ser submetido a 10 minutos de exercício. Apresentaram tempo de resposta de aproximadamente 3 minutos e faixa linear entre  $3,00 \times 10^{-6}$  e  $5,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para calibração *in vitro*.

Estudos realizados para a implantação de biossensores para determinação de glicose encontram-se mais avançados. Utilizam os mais diferentes modelos animais, tais como camundongos, ratos, cães, chimpanzés e humanos (KOSCHWANEZ; REICHERT, 2007). Estes biossensores podem ser tanto intravasculares quanto subcutâneos, sendo que existem certas complicações para a implantação intravascular quando são realizados experimentos de longa duração tais como complicações tromboembólicas e a propagação de infecções (KOSCHWANEZ; REICHERT, 2007).

Outro fato importante é dificuldade para se propor técnicas de calibração confiável, uma vez, que geralmente a calibração *in vivo* é inviável, assim, como alternativa se faz a calibração *in vitro* (YANG; ATANASOV; WILKINS -1999; ABDEL-HAMID; ATANASOV; WILKINS, 1995).

Diante do exposto pode se afirmar que o presente trabalho apresenta resultados preliminares, devido à pequena quantidade de amostras avaliadas, porém promissores uma vez que aponta para a possibilidade de emprego de um eletrodo, simples e de baixo custo, em determinação *in vivo*.

O grupo de Química Analítica Instrumental pretende dar continuidade a essa linha de pesquisa e está verificando a possibilidade de estudos com animais maiores.

## 4 CONCLUSÕES

Dentre os vegetais estudados para extração de extrato enzimático a banana (*Musa sp*) foi o mais adequado. O biossensor construído com 50 UA foi o que apresentou melhor resposta e o melhor pH foi de 7,00.

Eletrodos construídos com tubos de polietileno apresentaram resultados melhores que os construídos com agulhas.

Para medidas em soluções aquosas e *in vitro* observou-se morosidade no retorno a linha base o que pode ser contornado com o emprego de peróxido de hidrogênio na solução branco. Para medidas *in vivo* não houve problema com retorno a linha base o que pode ser atribuído ao oxigênio presente na corrente sanguínea do animal o que confere um meio oxidante adequado para a resposta do biossensor.

As principais características do eletrodo desenvolvido são: simplicidade de preparo, baixo custo, tamanho adequado para medidas *in vivo*, e desempenho satisfatórios, em termos de precisão e exatidão, para determinação de adrenalina em amostras de medicamentos e sangue. Quanto a medidas *in vivo*, os resultados preliminares foram promissores mostrando a possibilidade de utilização do biossensor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATILLI, B. S.; SULEIMAN, A. A. A piezoelectric immunosensor for detection of cocaine. **Microchem. Journal**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 174-179, 1996.

ABDEL-HAMID, I; ATANASOV, P; WILKINS, E. Development of a needle-type biosensor for intravascular glucose monitoring. **Anal. Chim. Acta**, Oxford, v. 313, p. 45-54, 1995.

BALASZCZUK, A. M. et al. Nitric oxide synthase blockade and body fluid volumes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 131-134, 2002.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz fundamentals of clinical chemistry**. 5<sup>th</sup> ed. Filadélfia: Sanders, 2001. 1091 p.

CAPELATO, M. D. ; FATIBELLO FILHO, O. Biossensores. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 15, p. 28-39, 1992.

CARUSO, C. S.; VIEIRA, I. C.; FATIBELLO FILHO, O. Determination of epinephrine and dopamine in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of cara root (*Dioscorea bulbifera*). **Anal. Letters**, Londres, v.32, n.1, p. 39-50, 1999.

CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 102, p. 29-45, 1962.

DAWSON, C. R.; MAGEE, R. J. Plant tirosinase (Polyphenol oxidase). **Methods Enzymol.**, v. 2, p. 817-827, 1995.

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clinica Chim. Acta**, Oxford, v. 334, p. 41-69, 2003.

EARL, C. D. et al. Pharmacological characterization of dopamine overflow in the striatum of the normal and MPTP-treated common marmoset, studied in vivo using

cyclic voltammetry, nomifensine and sulpiride. **Journal of Neuroscience Methods**, Oxford, v. 84, p. 201-209, 1998.

EGGINS, B. R. **Biosensors**: an introduction. Nova Iorque: Wiley Teubner, 1996. 224 p.

ERTL, P. et al. Rapid identification of viable *Escherichia coli* subspecies with a electrochemical screen-printed biosensor array. **Biosens. Bioelect.**, Oxford, v. 10, p. 907-916, 2003.

EVERETT, W. R.; RECHNITZ, G. A. Mediated bioeletrocatalytic determination of organophosphorous pesticides with a tyrosinase-based oxygen biosensor. **Anal. Chem.**, Washington, v. 70, p. 807-810, 1998.

FARMACOPÉIA Brasileira, 3. ed. São Paulo: 1977, p. 419-420.

FATIBELLO FILHO, O.; RAMOS, L. A.; LUPETTI, K. O. Dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea americana*). **Quim. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 197-201, 2003.

FATIBELLO FILHO, O. F.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.

FELIX, E. S.; YAMASHITA, M.; ANGNES, L. Epinephrine quantification in pharmaceutical formulations utilizing plant tissue biosensors. **Biosens. Bioelect.**, Oxford, v. 21, p. 2283-2289, 2006.

FERNANDES, J. C. B.; KUBOTA, L. T.; NETO, G. D. O. Potentiometric biosensor for L-ascorbic acid based on ascorbate oxidase of natural source immobilized on ethylene-vinylacetate membrane. **Anal. Chim. Acta**, Oxford, v. 385, n. 1, p. 3-12, 1999.

FRENSE, D.; MÜLLER, A.; BECKMANN, D. Detection of environmental pollutants using optical biosensor with immobilized algae cells. **Sensors and Actuators B**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 256-260, 1998.

FIGUEIREDO, E. C. et al. A home-made auto-sampler/injector commutator for flow analysis. **Journal of Automated Methods & Management in Chemistry**, Nova Iorque, v. 2006, p. 1-4, 2006.

GEORGANOPOULOU, D. G. et al. Development and comparison of biosensors for in-vivo applications. **Faraday Discuss.**, Londres, v. 116, p. 291-300, 2000.

GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9, ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1848 p.

GUILBAULT, G. G.; HOCK, B.; SCHMID, R. A piezoelectric immunobiosensor for atrazine in drinking water. **Biosen. Bioelectron.**, Oxford, v. 7, p. 411-419, 1992.

GUO, J. Z.; GUO, F. Z.; HONG, C. Y. Development of integrated chemiluminescence flow sensor for the determination of adrenaline and isoprenaline **Anal. Chim. Acta**, Oxford, v. 463, p. 257-263, 2002.

HANSEN, A. M. et al. Validation of a high performance liquid chromatography analysis for the determination of noradrenaline and adrenaline in human urine with an on-line sample purification. **Talanta**, Oxford, v. 50, p. 367-379, 1999.

HARPER, H. P. **Manual de química fisiológica**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1973. 586 p.

JANASEK, D.; SPOHN, U. Chemiluminometric flow injection analysis procedures for enzymatic determination of  $\alpha$ -alanine,  $\alpha$ -ketoglutarate and  $\alpha$ -glutamate. **Biosen. Bioelectron.**, Oxford, v. 14, p. 123-129, 1999.

KORMOS, F.; SZIRÁKI, L.; TARSICHE, I. Potentiometric biosensor for urinary glucose level monitoring. **Laboratory Robotics and Automation**, Indianápolis, v. 12, n. 6, p. 291-295, 2000.

KOSCHWANWZ, H. E.; REICHERT, W. M. In vitro, in vivo and post explantation testing of glucose-detecting biosensors: current methods and recommendations. **Biomaterials**, Oxford, v. 28, p. 3687-3703, 2007.

KÖßLINGER, C. et al. Quartz crystal microbalance for immunosensing. **Fresen. J. of Anal. Chem.**, Berlim, v. 349, n. 5, p. 349-354, 1994.

LEI, Y.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Microbial biosensors : a review. **Anal. Chim. Acta**, Oxford, v. 568, p. 200-210, 2006.

LI, G. et al. ISE analysis of hydrogen sulfide in cigarette smoke. **J. Chem. Educ.**, Washington, v.77, p.1049, 2000.

LI, F.; CUI, H.; LIN, X. Q. Determination of adrenaline by using inhibited Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> electrochemiluminescence. **Anal. Chim. Acta**, Oxford, v. 471, p. 187-194, 2002.

LI, X.; ROSENZWEIG, Z. A fiber optic sensor for rapid analysis of bilirubin in serum. **Anal. Chim. Acta**, Oxford ,v. 353, p. 263-273, 1997.

LI, X. M. et al. An integrated microcomputer system using immobilized cellular electrodes for drug screening. **Computers in Biology and Medicine**, Oxford, v. 18, p. 367 – 376, 1988.

LIU, A.; HONMA, I.; ZHOU, H. Amperometric biosensor based on tyrosinase-conjugated polysacchride hybrid film: Selective determination of nanomolar neurotransmitters metabolite of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in biological fluid. **Biosen. Bioelectron.**, Oxford, v. 21, p. 809-816, 2005.

LUPETTI, K. O.; RAMOS, L. A.; FATIBELLO, O. F. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistemas de análise por injeção

em fluxo com extrato bruto enzimático de abacate (*Persea americana*). **Quim. Nova**, São Paulo, v. 24, p. 77-86, 2001.

MAYER, A. M. Polyphenoloxidases in plants and fungi: going places? A review. **Phytochem.**, Oxford, v. 67, p. 2318-2331, 2006.

MEDINA, A. R.; DE CÓRDOVA, M. L. F.; DIAZ, A. M. Sensitive determination of adrenaline by means of a flow-through solid phase UV spectrophotometric sensing device. **Mikrochimica Acta**, Viena, v. 134, p. 101-105, 2000.

MELO, G. A.; SHIMIZU, M. M.; MAZZAFERA, P. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. **Phytochem.**, Oxford, v. 67, p. 277-285, 2006.

MOREIRA, L. N.; MAGALHÃES, C. S.; LUCCAS, P. O. Emprego de sistema em análise de fluxo contínuo com biossensor potenciométrico para determinação de adrenalina em medicamentos. **Infarma**, Brasília, v. 16, p. 59-62, 2005.

MORENO-BONDI, M. C. et al. Oxygen optrode for use in fiber-optic glucose biosensor. **Anal. Chem.**, Washington, v. 62, n. 21, p. 2377-2380, 1990.

NEAL, J. M. Effects of epinephrine in local anesthetics on the central and peripheral nervous systems: neurotoxicity and neural blood flow. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 124-134, 2003.

NEWMAN, J. D. et al. Biosensors: boldly going into the new millennium. **Sensors Review**, Bingley, v. 21, p. 268-271, 2001.

NIEMI, G. Advantages and disadvantages of adrenaline in regional anesthesia. **Best Practice & Research Clinical sensors review Anaesthesiology**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 229-245, 2005.

RAJESH et al. Development of potentiometric urea biosensor based on copolymer poly(N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film. **Reactive and Functional Polymers**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 51-59, 2005.

RECHNITZ, G. A. et al. A bio-selective membrane electrode prepared with living bacterial cells. **Anal. Chim. Acta**, Oxford, v. 94, p. 357-365, 1977.

REHER, S.; LEPKA, Y.; SCHWEDT, G. The potentiometric biosensor acetylcholine esterase as a model system. **Micdrochim. Acta**, Viena, v. 140, p. 15-20, 2002.

REDDY, R. R. K. et al. Estimation of triglycerides by a porous silicon based potentiometric biosensor. **Current Applied Physics**, Oxford, v. 3, p. 155-161, 2003.

ROCHA, A. M. C. N.; MORAIS, A. M. M. B. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from 'Joganored' apple. **Food Control**, Oxford, v. 12, p. 85-90, 2001.

ROSANO, T. G.; WHITLEY, R. J. **Catecholamines and serotonin**. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz fundamentals of clinical chemistry**. 5<sup>th</sup> ed. Filadélfia: Sanders, 2001. Cap. 27, p. 529-547.

ROSATTO, S. S. et al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.

ROTARIU, L.; BALA, C.; MAGEARU, V. New potentiometric microbial biosensor for ethanol determination in alcoholic beverages. **Anal. Chim. Acta**, Oxford, v. 513, p. 119-123, 2004.

SAURINA, J. et al. Potentiometric biosensor for lysine analysis based on chemically immobilized lysine oxidase membrane. **Anal. Chim. Acta**, Oxford, v. 371, p. 49-56, 1998.

SCOUTER, W. H.; LUONG, J. H. T.; BROWN, S. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 13, p. 178-185, 1995.

SHONS, A.; DORMAN, F.; NAJARIAN, J. An immunospecific microbalance. **J. Biomedical Materials Research**, Indianápolis, v. 6, n. 6, p. 565-570, 1972.

SIGNORI, C. A.; VIEIRA, I. C.; FATIBELLO, O. Biossensor amperométrico para determinação de fenóis usando extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorhiza*). **Quim. Nova**, São Paulo, v. 17, n. 01, p. 38-42, 1994.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1398 p.

STORRI, S. et al. Surface modifications for the development of piezoimmunosensors. **Biosens. Bioelectron.**, Oxford, v. 13, p. 347-357, 1998.

SU, X.; LI, S. F. Y. Serological determination of *Helicobacter pylori* infection using sandwiched and enzymatically amplified piezoelectric biosensor. *Anal. Chim. Acta*, Oxford, v. 429, p. 27-36, 2001.

SUMMER, J. B.; MIRBÄCK, K. **The enzymes-chemistry and mechanism of action**. Nova Iorque: Academic Press, 1951. V. 02, 739 p.

SZEPONIK, J. et al. Ultrasensitive bienzyme sensor for adrenaline. **Biosens. Bioelectron.**, Oxford, v. 12, p. 947-952, 1997.

THEVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications. **Biosens. Bioelectron.**, Oxford, v. 16, p. 121-131, 2001.

TORRES, C. A.; ROMERO, M. A.; CALATAYUD, M. J. FIA-Fluorimetric Determination of Adrenaline in Pharmaceutical Formulations by Oxidation with Molecular Oxygen. **Mikrochim. Acta**, Viena, v. 128, p. 187-190, 1998.

TRETTNAK, W.; WOLFSBEIM, O. S. A fiberoptic cholesterol biosensor with an oxygen optrode as the transducer. **Anal. Biochem.**, Oxford, v. 184, p. 124-127, 1990.

ÜNAL, M. Ü. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). **Food Chem.**, Oxford, v. 83, p. 7-11, 2003.

VIEIRA, I. C.; FATIBELLO, O. F. L-ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 412-418, 2000.

WHANZI, W. et al. A Selective Pharmaceutical Analysis Technique with Sensitive Piezoelectric Crystal Quartz Sensors. **Anal. Letters**, Oxford, v. 26, p. 2371-2383, 1993.

WILSON, G. S.; GIFFORD, R. Biosensors for real-time in vivo measurements. **Biosens. Bioelectron.**, Oxford, v. 20, p. 2388-2403, 2005.

WU, M. A lactate needle type biosensor for in vivo detection in muscular tissues. **Sensors and Actuators B**, Oxford, v. 66, p. 269-271, 2000.

YANG, Q.; ATANASOV, P.; WILKINS, E. Needle-type lactate biosensor. **Biosens. Bioelectron.**, Oxford, v. 14, p. 203-210, 1999.

## Anexo A – Parecer do Comitê de Ética



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063

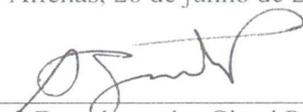


**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA - UNIFAL-MG**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto, protocolo nº 132/2007 “**Construção e caracterização de um minibiossensor para determinação de adrenalina em amostras de interesse farmacêutico**”, sob responsabilidade do **Prof. Dr. Pedro Orival Luccas**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Unifal-MG em reunião de 26/06/2007.

Alfenas, 26 de junho de 2007

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva  
Presidente da CEEA - Unifal-MG

**APÊNDICE A - Artigo publicado pela Revista Infarma**



# MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE POLIFENOL OXIDASES EM EXTRATO BRUTO DE BANANA (*MUSA SP.*): COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS

LIDIANE RAQUEL VEROLA MATAVELI  
NATALÍCIA DE JESUS ANTUNES  
MAÍSA RIBEIRO PEREIRA LIMA BRIGAGÃO  
PEDRO ORIVAL LUCCAS

Universidade Federal de Alfenas (Unifal – MG), Departamento de Ciências Exatas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, 37130-000, Alfenas – MG, Brasil.

Autor responsável: P.O. Luccas. E-mail: pedro@unifal-mg.edu.br

## INTRODUÇÃO

As enzimas polifenol oxidases (PFO), também, conhecidas como catecol oxidases, tirosinases ou catecolases, foram descobertas, em 1895, por Bourquelot e Bertrand (WHITAKER, 1972). São encontradas em altas concentrações em cogumelos, batata, abacate, folhas de chá, maçã e banana (*Musa sp.*), entre outros, e estão ligadas ao processo de escurecimento da parte comestível dos organismos em que estão presentes, denominado escurecimento enzimático. As PFO catalisam a oxidação de compostos fenólicos, promovendo a formação de o-quinonas, que passam por várias reações levando à formação dos pigmentos escuros. Esses compostos fenólicos, como a adrenalina, têm sido utilizados como substrato para medir a atividade enzimática no extrato bruto de vegetais.

A atividade dessas enzimas pode ser medida pelo consumo de oxigênio utilizando-se a técnica de Warburg (DAWSON & MAGEE, 1955) ou um eletrodo de oxigênio (MAYER et al., 1966); determinação com Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAE) com detecção eletroquímica (LI et al., 1990) e também pode ser feita a determinação espectrofotométrica (SUMMER & MYRBÄCK, 1951).

Quanto às medidas espectrofotométricas, estas são utilizadas para se acompanhar o desenvolvimento de uma reação enzimática que possua um produto ou reagente que absorva radiação ultravioleta ou visível. Assim, em condições adequadas, a velocidade da reação é proporcional à quantidade de enzima presente no extrato. Como muitas enzimas ainda não são encontradas puras, não é possível quantificá-las, sendo os resultados expressos em unidades de atividade (UA), definidas arbitrariamente como a quantidade de enzima capaz de aumentar em 0,001 unidades de absorbância por minuto (LUPETTI ET. al., 2003; HARPER, 1973). Para o cálculo da atividade geralmente é utilizada a fórmula abaixo que relaciona variação de

absorbância ( $\Delta$  abs), variação de tempo ( $\Delta$  T), o passo (b) e um determinado volume de amostra (V) (SUMMER & MYRBÄCK, 1951):

$$A \text{ (atividade)} = \Delta \text{ abs} \times 1000 / (\Delta T \times b \times V)$$

Outra maneira de calcular UA é através da medida da velocidade de reação para diferentes proporções de extrato e enzima, o que, em princípio, confere maior confiabilidade aos resultados (HARPER, 1973).

Devido à praticidade do emprego da fórmula, a maioria dos trabalhos que enfocam construção de biossensores utiliza-se desta ferramenta para o cálculo da atividade enzimática. Este trabalho objetivou um estudo comparativo entre as duas técnicas espectrofotométricas supracitadas de medida de atividade enzimática da PFO. Tal enzima tem sido usada na construção de biossensores para a determinação de diversos analitos (MOREIRA et al., 2005; LUPETTI et al., 2003; FATIBELLO & VIEIRA, 2002; ROSATTO ET. al., 2001; CARUSO ET. al., 1999; SIGNORI & FATIBELLO, 1994).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Reagentes e soluções

Foram utilizados os seguintes reagentes: Adrenalina, Sigma®; Dihidrogenofosfato de potássio, Synth®; Hidróxido de sódio, Vetec®; Polivinilpirrolidona (PVP), Henrifarma®; Soroalbumina bovina (BSA), Sigma®; Sulfato de cobre, Vetec®; Tartarato de sódio e potássio, Mallinkrodt®.

Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q®.

### Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: Espectrofotômetro UV –Vis, Shimadzu® UV-2401 PC; Espectrofo-

tômetro Vis, Femto® 435; Cubeta de quartzo com 1 cm de passo óptico; Centrífuga, Fanem® Excelsa Baby I; Liquidificador, ARNO®; Balança analítica, Sartorius® BP 210S; pH-metro, Schott® Handylab, Agitador magnético, Marconi®; Purificador de água, Milli-Q Academic®.

#### Obtenção do extrato bruto enzimático

Amostras de banana foram colhidas na cidade de Alfenas, MG. Uma massa de 25 g de frutos descascados foi triturada em 100 mL de tampão fosfato (pH = 7,0) e 2,5 g do agente protetor polivinilpirrolidona (PVP) em um homogeneizador durante 3 minutos. A mistura foi filtrada em gaze e centrifugada a 5000 rpm durante 30 minutos e o sobrenadante foi armazenado a 4 °C e utilizado como fonte enzimática (MOREIRA et al., 2005; LUPETTI et al., 2003; FATIBELLO & VIEIRA, 2002; ROSATTO et al., 2001; CARUSO et al., 1999; SIGNORI & FATIBELLO, 1994).

#### Determinação da atividade enzimática

Para cada extrato, a atividade da PFO foi determinada pela medida em triplicata da absorbância em 410 nm, monitorando a formação da o-quinona.

A velocidade de reação foi medida para quatro volumes diferentes (50, 100, 150 e 200 µL) de extrato bruto misturados a 2,4 mL de adrenalina 0,05 mol L<sup>-1</sup> em um volume final de reação de 3 mL completado com tampão fosfato (pH = 7,0).

A atividade enzimática foi definida como o coeficiente angular do gráfico da velocidade em função da quantidade de enzima multiplicado por 1000 (HARPER, 1973).

A atividade enzimática também foi determinada pela fórmula descrita por SUMMER & MYRBÄCK (1951), onde foram utilizados 2,8 mL da solução 0,05 mol L<sup>-1</sup> de adrenalina e 0,2 mL do extrato bruto. O  $\Delta$ Abs foi calculado para um  $\Delta$ T de 3 minutos.

#### Determinação da concentração de proteína total pelo método de biureto

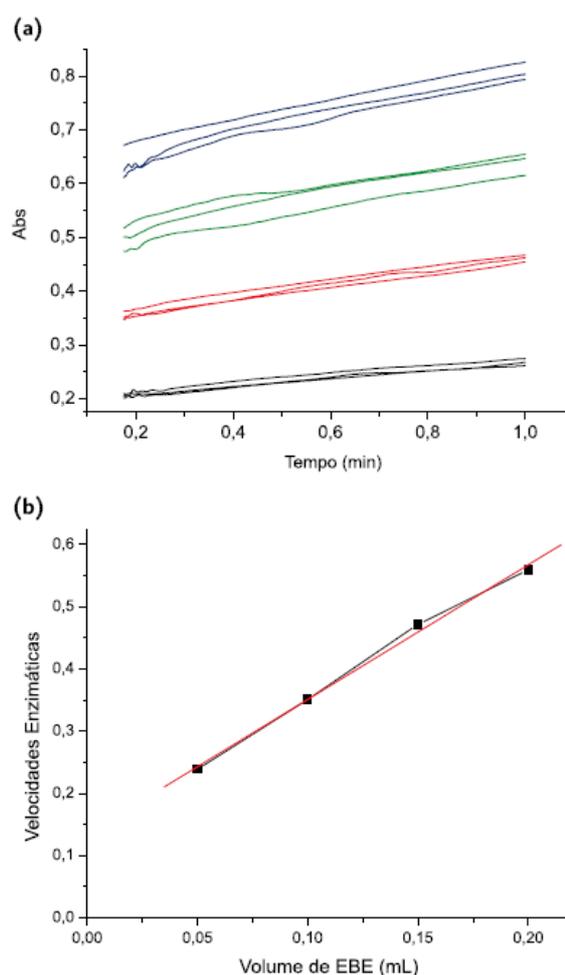
A determinação da concentração de proteína total das amostras foi feita pelo método espectrofotométrico de biureto em 540 nm (GORNALL *et. al*) após serem agitadas e incubadas por 15 minutos a 37°C, utilizando-se BSA como padrão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os gráficos necessários para o cálculo da atividade enzimática de um extrato pela técnica de medidas da velocidade de reação enzimática. Foram feitas medidas em triplicata de quatro concentrações diferentes de extrato bruto a média das medidas foram

inseridas na curva mostrada na Figura 1b cujo coeficiente angular indica o valor da UA do extrato, neste caso obtendo um valor de 2164 UA.

Com o intuito de se verificar a estabilidade da enzima, as medidas foram feitas por seis dias consecutivos e os resultados estão apresentados na tabela 1. Não foi observado um comportamento regular de degradação da enzima, nota-se também um desvio acentuado nos valores de atividade enzimática o que pode ser atribuído à heterogeneidade da amostra de extrato bruto. A concentração de proteínas foi medida para se verificar a atividade específica da enzima e verificou-se que também não houve uma degradação apreciável de proteínas durante o período estudado assim a variabilidade de atividade e atividade específica apresentaram perfis semelhantes em função do tempo.



**Figura 1.** Técnica para medida de atividade enzimática através da velocidade de reação: (a) velocidade de reação para diferentes concentrações de extrato; (b) curva da velocidade em função da concentração.

**Tabela 1.** Teor de proteína; atividade calculada através da fórmula (F) e da curva de velocidade (C) seguidas de suas atividade específica (AE) definida como unidade por miligrama de proteína.

Dia	Proteína (mg mL <sup>-1</sup> )	Atividade da polifenol oxidase			
		F	AE	C	AE
1	16,81±0,6121	952,8±27,46	56,93±6,754	1742±128,2	103,9±7,626
2	15,31±1,221	929,2±45,81	60,53±6,723	1985±67,68	129,6±4,409
3	16,04±0,8872	897,9±10,12	55,98±4,891	2164±46,67	136,4±2,969
5	18,81±0,3267	918,2±61,33	48,81±10,04	1376±103,2	73,13±5,483
6	18,13±0,5745	864,0±37,81	47,66±9,032	2262±164,7	123,5±9,051

Com os resultados obtidos (Tabela 1) pode se notar que a medida de atividade enzimática empregando a equação apresentou resultados sistematicamente inferiores aos obtidos empregando a técnica das velocidades de reação. Isto pode ser atribuído ao fato de que os dados foram obtidos fora da faixa de resposta linear, uma vez que é estipulado o tempo de 3 minutos para a aquisição dos dados (SUMMER & MYRBÄCK, 1951). Quando se empregou tempos menores os valores calculados com a fórmula foram mais próximos aos obtidos com a curva de velocidade.

## CONCLUSÃO

O estudo comparativo entre as duas técnicas para medidas de atividade enzimática indica diferenças de resultados. O método empregando a equação é mais rápido, porém por utilizar menos dados, uma vez que pressupõe que o sistema possui um comportamento linear na faixa de concentração estudada, é mais susceptível a erros.

O método empregando as medidas de velocidades das reações em diversas concentrações de extrato é moroso, porém menos susceptível a erros uma vez que utiliza mais medidas e permite verificar se há comportamento linear na faixa de concentração empregada para as medidas da atividade enzimática. Considerando o exposto, conclui-se que a utilização da equação para o cálculo da atividade enzimática apresentou subestimação dos valores de atividade enzimática.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARUSO, C. S.; VIEIRA, I. C.; FATIBELLO, O. Determination of epinephrine and dopamine in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of cara root (*Dioscorea bulbifera*). *Anal. Lett.*, v. 32, p. 39-50, 1999.
- DAWSON, C. R.; MAGEE, R. J. Plant tyrosinase (Poliphenol oxidase). *Methods Enzymol.*, v. 2, p. 817-827, 1955.

FATIBELLO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Quim. Nova*, v. 25, p. 455-464, 2002.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. J. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, v. 177, p. 751 - 766, 1949)

HARPER, H. P. Manual de química fisiológica, 3 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 1973.

LI, Z. F.; CHRISTENSEN, B. M.; TRACY, W. Electrochemical determination of diphenol oxidase activity using high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, v. 190, p. 354-359, 1990.

LUPETTI, K. O.; RAMOS, L. A.; FATIBELLO, O. F. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistemas de análise por injeção em fluxo com extrato bruto enzimático de abacate (*Persea americana*). *Quim. Nova*, v. 26, p. 197-201, 2003.

MAYER, A. M.; HAREL, E.; BEN-SHAUL, R. Assay of catechol oxidase – a critical comparison of methods. *Phytochemistry*, v. 5, p. 783-789, 1966.

MOREIRA, L. N.; MAGALHÃES, C. S.; LUCCAS, P. O. Emprego de sistema de análise em fluxo contínuo com biossensor potenciométrico para determinação de adrenalina em medicamentos. *Infarma*, v. 16, p. 59-62, 2005.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Quim. Nova*, v. 24, p. 77-86, 2001.

SIGNORI, C. A.; FATIBELLO, O. Biossensor amperométrico para a determinação de fenóis usando um extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorhiza*). *Quim. Nova*, v. 17, p. 38-42, 1994.

SUMMER, J. B.; MYRBÄCK, K. The Enzymes-chemistry and mechanism action. New York, Academic Press Inc. Publishers, 1951, v. 3, cap. 57.

WHITAKER, J. R. principles of enzymology for food sciences, New York: Marcel Dekker, 1972.