

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DANIELA BRONDANI

DESENVOLVIMENTO DE BIOCENSORES PARA
DETERMINAÇÃO DE ADRENALINA

Florianópolis – SC

2010

DANIELA BRONDANI

DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSORES PARA
DETERMINAÇÃO DE ADRENALINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof^ª Dr^a Iolanda da Cruz Vieira

Florianópolis – SC

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

B869d Brondani, Daniela

Desenvolvimento de biossensores para determinação de adrenalina [dissertação] / Daniela Brondani ; orientadora Iolanda da Cruz Vieira. - Florianópolis, SC, 2010.

97 p.: grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Biossensor. 3. Enzimas. 4. Líquido iônico. 5. Adrenalina. I. Vieira, Iolanda da Cruz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

DANIELA BRONDANI

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES PARA
DETERMINAÇÃO DE ADRENALINA

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de
Mestre em Química no **Programa de Pós-Graduação em Química** da
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Iolanda da Cruz Vieira
Orientadora

Prof. Dr. Almir Spinelli

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Prof. Dr. Luiz Augusto dos
Santos Madureira

*Aos meus pais,
Nestor e Pierina.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por tudo;

Aos meus pais, Nestor e Pierina, que são os maiores responsáveis pelo que sou e que conquistei até hoje;

Aos meus irmãos, Paula e Marcelo, por todo carinho e atenção;

À Prof^a Dr^a Iolanda da Cruz Vieira pela orientação, incentivo e dedicação durante todo o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Jairton Dupont pela doação dos líquidos iônicos e à pós-doutoranda Carla Weber Scheeren pela síntese, caracterização e contribuição ativa nos trabalhos em colaboração;

Ao Prof. Dr. Almir Spinelli, pelas valiosas contribuições iniciais neste trabalho;

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a todos os professores do Departamento de Química, especialmente àqueles que contribuíram para minha formação acadêmica;

A todos os professores da banca, por aceitarem fazer parte da mesma;

À Prof^a Dr^a Karine Arend (URI-FW) pelo essencial estímulo à pesquisa durante a graduação e, especialmente, por ter me incentivado a realizar as provas de seleção do mestrado da UFSC;

Ao meu namorado Eduardo, pela ajuda, amor e compreensão, características que o tornam tão especial;

Aos colegas do Laboratório de Biossensores (LaBios) – Ana, Eduardo, Sally e Suellen – pela amizade e importante ajuda sempre que precisei;

Ao Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago – UFSC, pela doação dos produtos farmacêuticos;

À empresa Novozymes pela doação da enzima lacase;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

LISTA DE TRABALHOS GERADOS A PARTIR DESTA DISSERTAÇÃO

■ Artigos publicados em revistas científicas no período decorrente da presente dissertação de mestrado:

1 – BRONDANI, D.; DUPONT, J.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Development of biosensor based on ionic liquid and corn peroxidase immobilized on chemically crosslinked chitin. **Sens. Actuators B**, 138, 236–243, 2009.

2 – BRONDANI, D.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT J.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on platinum nanoparticles dispersed in ionic liquid and laccase for determination of adrenaline. **Sens. Actuators B**, 140, 252–259, 2009.

■ Trabalhos publicados em congressos:

1 – BRONDANI, D.; VIEIRA, I. C. Determinação de epinefrina usando biossensor de peroxidase imobilizada em quitina quimicamente modificada. In: XVI Encontro de química da Região Sul (SBQ-Sul), Blumenau-SC: Livro de Resumos do **XVI SBQ-Sul**, 2008.

2 – BRONDANI, D.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Biossensor para adrenalina usando líquido iônico e peroxidase de vegetal imobilizada em quitina. In: XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE), Fortaleza-CE: Livro de Resumo do **XVII SIBEE**, 2009.

3 – BRONDANI, D.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Biossensor contendo lacase e nanopartículas de platina em líquido iônico para determinação de epinefrina. In: XVII Encontro de Química da Região Sul (SBQ-Sul), Rio Grande-RS: Resumos do **XVII SBQ-Sul**, 2009. (*apresentação oral*).

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos e aplicados novos biossensores para a determinação de adrenalina através da voltametria de onda quadrada. Foram construídos dois biossensores diferentes, sendo o primeiro, um biossensor de pasta de carbono contendo líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMI.PF₆) e peroxidase de milho (*Zea mays* L.) imobilizada em quitina quimicamente modificada com glioxal e carbodiimida, e o segundo, um biossensor contendo microcápsulas de lacase e nanopartículas de platina dispersas em líquido iônico (Pt-BMI.PF₆). As enzimas peroxidase e lacase catalisam a oxidação da adrenalina a sua correspondente *o*-quinona, a qual é reduzida eletroquimicamente na superfície de cada eletrodo a um potencial de -0,23 V e -0,21 V vs. Ag/AgCl, respectivamente. Sob condições experimentais previamente otimizadas para cada um dos biossensores, foram construídas as curvas analíticas a partir da corrente resultante vs. concentração de adrenalina, apresentando linearidade em um intervalo de $9,89 \times 10^{-7}$ a $1,22 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e $9,99 \times 10^{-7}$ a $2,13 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $2,27 \times 10^{-7}$ e $2,93 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente. A recuperação da adrenalina nas amostras de formulações injetáveis variou de 97,9 a 100,8% e 95,5 a 104,2%, respectivamente para os eletrodos desenvolvidos. Por fim, a quantificação da adrenalina usando esses biossensores apresentou concordância com o método oficial, confirmando que esses métodos propostos representam uma alternativa viável para determinação dessa catecolamina em formulações farmacêuticas.

Palavras-Chave: Biossensor, enzima, líquido iônico, adrenalina.

ABSTRACT

In this work were developed and applied new biosensors for the adrenaline determination by square-wave voltammetry. Two different biosensors were constructed: the first, a biosensor of the carbon paste containing ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate (BMI.PF₆) and peroxidase of the corn (*Zea mays* L.) immobilized in chitin chemically crosslinked with glyoxal and carbodiimide, and the second, a biosensor containing laccase microcapsules and platinum nanoparticles dispersed in ionic liquid (Pt-BMI.PF₆). The enzymes peroxidase and laccase catalyze the oxidation of adrenaline to its corresponding *o*-quinone, which is electrochemically reduced on the surface of each electrode at a potential of -0.23 V and -0.21 V vs. Ag/AgCl, respectively. Using the experimental conditions previously optimized for each one of the biosensors, the analytical curves were built from the resulting current *versus* concentration of adrenaline responding linearly in a range of 9.89×10^{-7} to 1.22×10^{-4} mol L⁻¹ and 9.99×10^{-7} to 2.13×10^{-4} mol L⁻¹, with a detection limit of 2.27×10^{-7} and 2.93×10^{-7} mol L⁻¹, respectively. The recovery of adrenaline in injectable formulations samples ranged from 97.9 to 100.8% and from 95.5 to 104.2%, respectively for the developed electrodes. Finally, the quantification of adrenaline using these biosensors showed agreement with the official method, confirming that those proposed methods represent a viable alternative for determination of that catecholamine in pharmaceutical formulations.

Keywords: Biosensor, enzyme, ionic liquid, adrenaline.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biocomponentes e transdutores empregados na construção de biossensores.....	18
Figura 2. Diagramas que mostram a atividade enzimática através do modelo do encaixe induzido.....	21
Figura 3. Gráfico da velocidade da reação em função da concentração do substrato, para uma enzima que obedeça à cinética de Michaelis-Menten.....	22
Figura 4. Grupo Fe(III) protoporfirina IX (“grupo heme”), sítio ativo de muitas enzimas peroxidases.....	24
Figura 5. Representação esquemática do ciclo catalítico da lacase. Sub: substrato; Sub●: substrato oxidado radicalar.....	25
Figura 6. Representação estrutural do sítio ativo das lacases. Tipo 1 ou azul (T1); Tipo 2 (T2) e Tipo 3 (T3).....	26
Figura 7. Métodos de imobilização de enzimas.....	28
Figura 8. Estrutura química da quitina (A) e do seu derivado – quitosana (B).....	30
Figura 9. Exemplos de líquidos iônicos 1,3-dialquilimidazólio.....	31
Figura 10. Estrutura química da adrenalina.....	35
Figura 11. Sinal de excitação da voltametria cíclica.....	38
Figura 12. Voltamograma cíclico.....	39
Figura 13. Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada.....	40
Figura 14. Voltamogramas de onda quadrada (1) processo redox de um sistema reversível e (2) processo redox de um sistema irreversível.....	41
Figura 15. Reação entre guaiacol e peróxido de hidrogênio, catalisada pela enzima peroxidase.....	46
Figura 16. Determinação da atividade enzimática da peroxidase....	51
Figura 17. Estudo da estabilidade da peroxidase do extrato de milho verde armazenado em refrigerador (4 °C).....	52
Figura 18. Esquema proposto para imobilização da peroxidase em quitina quimicamente modificada.....	54
Figura 19. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de quitina em pó antes (A) e após modificação química (B)	55
Figura 20. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biossensores contendo (A) Nujol e (B) líquido iônico BMI.PF ₆	56
Figura 21. Representação esquemática da oxidação/redução da adrenalina na superfície do biossensor. PER _{red} : peroxidase	

reduzida e PER_{oxi} : peroxidase oxidada.....	57
Figura 22. Voltamogramas cíclicos (A) e de onda quadrada (B) obtidos usando biossensores contendo Nujol: BMI.PF ₆ nas proporções (I) 100:0 (m/m); (II) 50:50 (m/m) e (III) 0:100% (m/m), em solução tampão fosfato (pH 7,0) contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de adrenalina e $9,69 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio. (A) velocidade de 100 mV s ⁻¹ ; (B) frequência de 80 Hz, amplitude de 60 mV, incremento de 5,0 mV. Inserido: valores de corrente referentes a cada composição.....	59
Figura 23. Estudo da concentração de enzima nos biossensores utilizando solução contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de adrenalina e $9,69 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0).....	61
Figura 24. Efeito do pH sobre a resposta dos biossensores utilizando solução contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de adrenalina e $9,69 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹	62
Figura 25. Efeito da concentração do peróxido de hidrogênio sobre a resposta dos biossensores utilizando solução contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de adrenalina em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0).....	63
Figura 26. Investigação dos parâmetros de voltametria de onda quadrada sobre a resposta analítica dos biossensores utilizando solução contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de adrenalina e $9,69 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0). (A) Estudo da frequência; (B) Estudo da amplitude; (C) Estudo do incremento.....	64
Figura 27. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor I (A) e o biossensor II (B), em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) para (a) $9,69 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio e soluções de adrenalina nas seguintes concentrações: (b) $9,89 \times 10^{-7}$; (c) $1,98 \times 10^{-6}$; (d) $5,91 \times 10^{-6}$; (e) $9,80 \times 10^{-6}$; (f) $1,94 \times 10^{-5}$; (g) $2,89 \times 10^{-5}$; (h) $3,81 \times 10^{-5}$; (i) $5,61 \times 10^{-5}$; (j) $7,34 \times 10^{-5}$; (k) $9,01 \times 10^{-5}$; (l) $1,06 \times 10^{-4}$ e (m) $1,22 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em frequência de 80 Hz, amplitude de 60 mV e incremento de 5,0 mV. Inserido: curvas analíticas correspondentes.....	66
Figura 28. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando (a) EPC; (b) biossensor-BMI.PF ₆ ; (c) biossensor-Pt-BMI.PF ₆ em solução contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de adrenalina em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,5); frequência de 20 Hz; amplitude de 80 mV, incremento de 5,0 mV.....	70

Figura 29. Representação esquemática do processo enzimático entre a adrenalina (A), oxigênio e lacase, e a redução eletroquímica da adrenalinaquinona (B) na superfície do biossensor. LAC _{red} : lacase na forma reduzida e LAC _{oxi} : lacase na forma oxidada.....	71
Figura 30. Voltamogramas cíclicos (A) e de onda quadrada (B) usando Nujol:Pt-BMI.PF ₆ nas razões (a) 100:0, (b) 75:25, (c) 50:50, (d) 25:75 e (e) 0:100% (m/m) no biossensor de lacase imerso em solução tampão fosfato pH 6,5 contendo (A) $4,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de adrenalina à 100 mV s ⁻¹ e (B) $1,3 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ adrenalina em frequência de 20 Hz, amplitude de 80 mV e incremento de 5,0 mV. Inserido: valores de corrente para cada composição do biossensor.....	73
Figura 31. Estudo da concentração de enzima no biossensor utilizando solução contendo $1,3 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de adrenalina em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,5).....	74
Figura 32. Efeito do eletrólito suporte/pH sobre a resposta do biossensor utilizando solução contendo $1,3 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de adrenalina em tampão acetato (pH 4,0–5,0) ou fosfato (pH 6,0–7,5) 0,1 mol L ⁻¹	75
Figura 33. Investigação dos parâmetros de voltametria de onda quadrada sobre a resposta analítica do biossensor utilizando solução contendo $1,3 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de adrenalina em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,5). (A) Estudo da frequência; (B) Estudo da amplitude; (C) Estudo do incremento.....	76
Figura 34. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto em (a) solução tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 6,5) e soluções de adrenalina nas seguintes concentrações: (b) $9,99 \times 10^{-7}$; (c) $4,97 \times 10^{-6}$; (d) $9,90 \times 10^{-6}$; (e) $1,96 \times 10^{-5}$; (f) $2,91 \times 10^{-5}$; (g) $3,85 \times 10^{-5}$; (h) $5,66 \times 10^{-5}$; (i) $7,41 \times 10^{-5}$; (j) $9,09 \times 10^{-5}$; (k) $1,23 \times 10^{-4}$; (l) $1,52 \times 10^{-4}$; (m) $1,74 \times 10^{-4}$ e (n) $2,13 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em frequência de 20 Hz, amplitude de 80 mV e incremento de 5,0 mV. Inserido: curva analítica da adrenalina.....	78
Figura 35. Estudo da estabilidade e tempo de vida útil do biossensor proposto usando $1,3 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de adrenalina em solução tampão fosfato (pH 6,5).....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados físico-químicos de alguns líquidos iônicos baseados em 1-alkil-3-metilimidazólio.....	32
Tabela 2. Parâmetros de otimização do método proposto.....	65
Tabela 3. Recuperação de adrenalina em formulações farmacêuticas usando os biossensores propostos.....	68
Tabela 4. Determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas usando método padrão e os biossensores propostos....	69
Tabela 5. Parâmetros de otimização do método proposto.....	77
Tabela 6. Recuperação de adrenalina em formulações farmacêuticas usando o biossensor proposto.....	80
Tabela 7. Determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas usando método padrão e o biossensor proposto.....	81
Tabela 8. Biossensores e eletrodos modificados para determinação de adrenalina.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – Absorbância

BMI.PF₆ – Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio

DNA – Ácido desoxirribonucleico (inglês: deoxyribonucleic acid)

EPC – Eletrodo de pasta de carbono

Er – Erro relativo

FETs – Transistores efeito de campo (inglês: Field Effect Transistors)

IUPAC – União internacional de química pura e aplicada (inglês: International Union of Pure and Applied Chemistry)

K_M – Constante de Michaelis-Menten

LIs – Líquidos iônicos

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

Pt-BMI.PF₆ – Nanopartículas de platina dispersas em hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio

RNA – Ácido ribonucleico (inglês: ribonucleic acid)

SAMs – Monocamadas auto-organizadas (inglês: self-assembled monolayers)

SNC – Sistema nervoso central

UV-vis – Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. BIOSSENSORES	17
1.2. ENZIMAS	19
1.2.1. Peroxidase	23
1.2.2. Lacase	25
1.3. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	27
1.3.1. Quitina	29
1.4. LÍQUIDOS IÔNICOS	30
1.5. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	32
1.6. CATECOLAMINAS	34
1.6.1. Adrenalina	34
1.7. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS	36
1.7.1. Voltametria	37
1.7.1.1. Voltametria Cíclica.....	37
1.7.1.2. Voltametria de Onda Quadrada.....	39
2. OBJETIVOS	41
2.1. OBJETIVO GERAL	41
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
2.2.1. Biossensor contendo líquido iônico e peroxidase imobilizada em quitina modificada	41
2.2.2. Biossensor contendo lacase e nanopartículas de platina em líquido iônico	41
3. PARTE EXPERIMENTAL	43
3.1. INSTRUMENTAÇÃO	43
3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES	44
3.3. METODOLOGIA	45
3.3.1. Biossensor contendo líquido iônico e peroxidase imobilizada em quitina modificada	45
3.3.1.1. Obtenção do extrato enzimático.....	45
3.3.1.2. Determinação da atividade enzimática da peroxidase.....	45
3.3.1.3. Reticulação da quitina.....	46
3.3.1.4. Imobilização da peroxidase em quitina modificada.....	47
3.3.1.5. Construção dos biossensores.....	47
3.3.1.6. Medidas eletroquímicas.....	48
3.3.2. Biossensor contendo lacase e nanopartículas de platina em líquido iônico	48
3.3.2.1. Construção dos biossensores.....	48

3.3.2.2. Medidas eletroquímicas.....	49
3.3.3. Preparação das amostras e determinação de adrenalina.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1. BIOSSENSOR CONTENDO PEROXIDASE IMOBILIZADA EM QUITINA MODIFICADA E LÍQUIDO IÔNICO.....	51
4.1.1. Estudo da atividade e estabilidade da peroxidase.....	51
4.1.2. Quitina quimicamente modificada e imobilização da peroxidase.....	52
4.1.3. Morfologia dos eletrodos.....	55
4.1.4. Processo enzimático na superfície do eletrodo.....	56
4.1.5. Otimização do método.....	58
4.1.5.1. Porcentagem de líquido iônico.....	58
4.1.5.2. Concentração de enzima.....	60
4.1.5.3. Efeito do pH e concentração de peróxido de hidrogênio.....	61
4.1.5.4. Parâmetros de voltametria de onda quadrada.....	63
4.1.6. Curva analítica da adrenalina.....	65
4.1.7. Repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade dos biossensores.....	67
4.1.8. Interferentes.....	67
4.1.9. Estudo de recuperação.....	68
4.1.10. Determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas.....	68
4.2. BIOSSENSOR CONTENDO LACASE E NANOPARTÍCULAS DE PLATINA EM LÍQUIDO IÔNICO... 	69
4.2.1. Contribuição das nanopartículas em líquido iônico.....	69
4.2.2. Reação enzimática na superfície do eletrodo.....	70
4.2.3. Otimização do método.....	72
4.2.3.1. Porcentagem de líquido iônico contendo nanopartículas.....	72
4.2.3.2. Porcentagem de enzima.....	74
4.2.3.3. Eletrólito suporte e pH.....	74
4.2.3.4. Parâmetros de voltametria de onda quadrada.....	75
4.2.4. Curva analítica da adrenalina.....	77
4.2.5. Repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade do biossensor.....	78
4.2.6. Interferentes e estudo de recuperação.....	79
4.2.7. Determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas.....	80

4.3. COMPARAÇÃO DOS SENSORES DESENVOLVIDOS PARA DETERMINAÇÃO DE ADRENALINA COM OS REPORTADOS NA LITERATURA.....	81
5. CONCLUSÕES.....	83
6. REFERÊNCIAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. BIOSSENSORES

Biossensores podem ser definidos como dispositivos que convertem uma resposta biológica em um sinal elétrico proporcional à concentração do analito na amostra. O elemento biológico de reconhecimento (biorreceptor) utilizado na construção de biossensores é bastante variado, podendo-se destacar alguns, tais como enzimas, tecidos vegetais ou animais, anticorpos, antígenos, células ou organismos inteiros, organelas, DNA, oligonucleotídeos e, inclusive, materiais biomiméticos (biorreceptores sintéticos). Este biorreceptor é imobilizado junto à superfície de um transdutor (dispositivo capaz de transformar um tipo de sinal em outro), o qual é classificado em: eletroquímico, óptico, piezoelétrico ou calorimétrico. Os transdutores eletroquímicos são os mais empregados em biossensores, os quais podem ser amperométricos, potenciométricos, transistores efeito de campo (FETs – *Field Effect Transistors*) ou condutimétricos (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; VADGAMA e CRUMP, 1992; MELLO e KUBOTA, 2002; CÂMPAS *et al.*, 2008; GRIESHABER *et al.*, 2008).

A Figura 1 apresenta esquematicamente os principais biocomponentes e transdutores empregados na construção de biossensores. O funcionamento destes biossensores baseia-se na interação seletiva do analito com o biorreceptor. Esta interação resulta na variação de alguma propriedade físico-química (transferência de elétrons, variação de pH ou de massa, absorção e emissão de radiações eletromagnéticas, alteração de temperatura, etc.) que é reconhecida e medida por um transdutor adequado, e, finalmente, ocorre a amplificação e o processamento do sinal correspondente à concentração do analito na amostra. Em adição, cabe ressaltar que a interação do analito com o biorreceptor pode acontecer através de duas principais formas, de acordo com o elemento biológico empregado, sendo elas: interação por afinidade (ex.: oligonucleotídeos – reconhecimento das sequências complementares) e *via* biocatalítica (ex.: enzimas – reconhecimento do substrato específico e catálise das reações correspondentes) (MELLO e KUBOTA, 2002; D’ORAZIO, 2003; CÂMPAS *et al.*, 2008; GRIESHABER *et al.*, 2008).

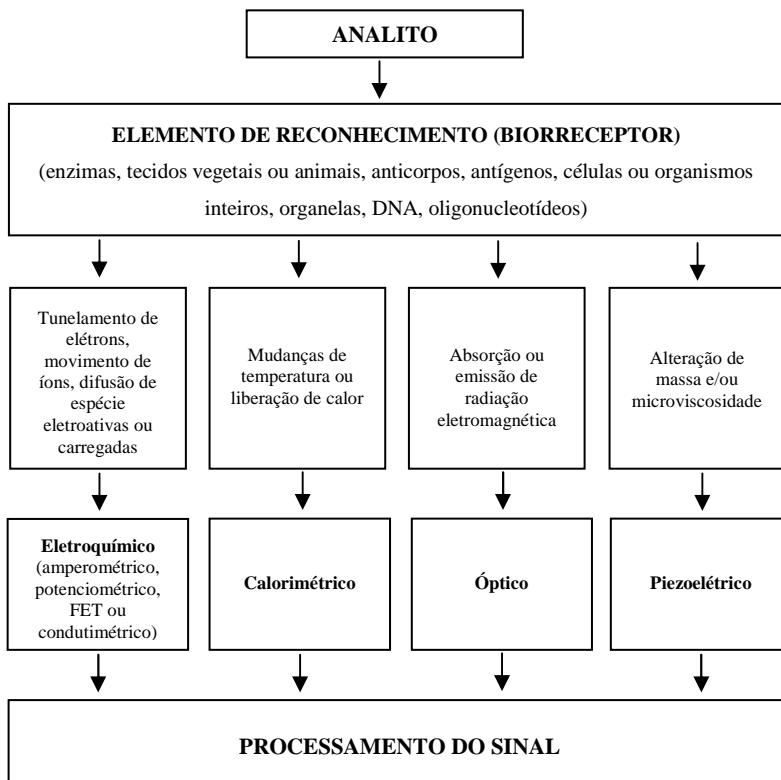


Figura 1. Biocomponentes e transdutores empregados na construção de biossensores (traduzido e adaptado de MELLO e KUBOTA, 2002).

Na construção dos biossensores, diferentes tipos de eletrodos têm sido empregados, destacando-se os eletrodos de pasta de carbono, carbono vítreo, ouro e os eletrodos impressos. O eletrodo de pasta de carbono (EPC), proposto por Adams (em 1958), apresenta grandes vantagens sobre os eletrodos sólidos convencionais, especialmente pela possibilidade de modificação interna do material eletródico. Além disso, estes eletrodos oferecem versatilidade, baixa corrente de fundo, baixo custo e facilidade de renovação da superfície. Devido a essas propriedades, os eletrodos à base de pasta de carbono são amplamente utilizados na fabricação de biossensores (PEREIRA *et al.*, 2002; ŠVANCARA *et al.*, 2009).

Desde o desenvolvimento do primeiro biossensor, construído por Clark & Lyons, em 1962, diversos outros biossensores foram

construídos utilizando diferentes tipos de materiais biológicos, sendo os eletrodos de enzimas (biossensores enzimáticos) os mais difundidos. Além disso, nos últimos anos, novos materiais têm sido empregados na modificação de biossensores com o objetivo de melhorar o seu desempenho, dentre estes modificadores destacam-se os líquidos iônicos, nanotubos de carbono e as nanopartículas metálicas. Assim, em razão da intensa pesquisa no desenvolvimento de novos e modernos biossensores, a aplicação desses dispositivos tem avançado rapidamente, abrangendo importantes áreas, tais como alimentícia, clínica, biomédica, ambiental e farmacêutica. Assim como as técnicas analíticas sofisticadas, os biossensores apresentam rapidez, baixo custo, facilidade na operação, estabilidade, boa sensibilidade e seletividade na detecção e quantificação de diversos analitos. Portanto, devido às inúmeras vantagens apresentadas pelos biossensores, pode-se justificar o crescente desenvolvimento desta linha de pesquisa e sua notória importância no campo científico e tecnológico (MELLO e KUBOTA, 2002; TELES e FONSECA, 2008; CÂMPAS *et al.*, 2008; NAYAK *et al.*, 2009; VELASCO-GARCIA, 2009; DHAWAN *et al.*, 2009).

1.2. ENZIMAS

Enzimas, catalisadores dos sistemas biológicos, são extraordinários dispositivos moleculares, que determinam o perfil de transformações químicas. As características mais impressionantes destas biomoléculas são o seu poder catalítico e sua especificidade. As enzimas aceleram as reações, superando em eficiência muitos catalisadores sintetizados em laboratório. Além disso, estas moléculas são altamente específicas tanto na reação catalisada como na sua escolha de reagentes, os quais são chamados de substratos. Uma enzima geralmente catalisa uma reação química única ou um conjunto de reações estreitamente relacionadas, evitando reações colaterais (STRYER, 1996; CHAMPE e HARVEY, 1996; LEHNINGER *et al.*, 2006).

Todas as enzimas conhecidas são proteínas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA cataliticamente ativas (ribozimas). As proteínas são altamente eficientes na catálise de inúmeras reações químicas, por causa da sua capacidade de se ligar especificamente a uma larga variedade de moléculas. Através de diversas forças intermoleculares, as enzimas aproximam-se de substratos em uma orientação ideal com o propósito de formar e quebrar ligações químicas. Em essência, elas catalisam reações pela estabilização dos estados de transição (as espécies químicas de maior nível de energia nos caminhos

reacionais), e fazendo isto seletivamente, estas biomoléculas determinam qual das várias reações químicas potenciais realmente ocorre (VOET e VOET, 1995; STRYER, 1996; LEHNINGER *et al.*, 2006).

Toda enzima possui um sítio ativo (centro ativo), local onde se processam as reações com determinados substratos. Em geral, este centro ativo é constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia de proteína e um grupo não-protéico, sendo responsável pela atividade biológica da enzima. Algumas enzimas dependem exclusivamente da sua própria estrutura protéica para exercer sua atividade catalítica, sendo denominadas de apoenzimas. Entretanto, outras enzimas necessitam de um ou mais componentes não-protéicos adicionais para seu funcionamento, conhecidos como cofatores. Estes cofatores podem ser de natureza inorgânica (ex.: íons metálicos – Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) ou orgânica (ex.: vitaminas – riboflavina, tiamina, biotina), sendo que cofatores orgânicos recebem a denominação de coenzimas. O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator é denominado de holoenzima. Em certas enzimas, a coenzima ou o íon metálico está ligado fracamente ou apenas de forma transitória à parte protéica, enquanto que em outras se ligam de modo firme e permanente, neste último caso, recebe a denominação de grupo prostético. Além disso, a atividade enzimática é dependente da temperatura e pH. Uma enzima submetida a agentes como calor, solventes orgânicos, ácidos e bases fortes, entre outros, pode sofrer desnaturação (perda da conformação protéica nativa), tornando-se inativa (DIXON e WEBB, 1979; VOET e VOET, 1995; STRYER, 1996; LEHNINGER *et al.*, 2006; DEVLIN, 2007).

As enzimas são responsáveis por converter um tipo de substância (substrato) em outro (produto), sendo extremamente específicas nas reações que catalisam. Pelo fato de serem proteínas com estrutura terciária ou quaternária, as enzimas são dotadas de dobramentos tridimensionais em suas cadeias polipeptídicas, o que lhes confere uma forma característica e única (STRYER, 1996; LEHNINGER *et al.*, 2006). Em 1894, Hermann Emil Fischer propôs um modelo para explicar a especificidade enzimática, no qual tanto as enzimas como os substratos apresentam formas complementares, fazendo com que se encaixem de maneira precisa. No entanto, esta teoria, conhecida como modelo chave-fechadura, falha em explicar a estabilização dos estados de transição que as enzimas exibem. Desta forma, está evidente agora que os formatos dos sítios ativos de muitas enzimas são acentuadamente modificados pela ligação do substrato, conforme postulado por Daniel E. Koshland Jr., em 1958. De acordo com esta teoria, uma vez que as

enzimas exibem estruturas flexíveis, as cadeias laterais dos aminoácidos que formam os sítios ativos sofrem uma reorientação de maneira que as suas posições potencializem a ação catalítica da enzima. Então, os sítios ativos continuam a sofrer modificações até que o substrato esteja completamente ligado, sendo definido neste momento a seu formato final. Este processo de reconhecimento dinâmico é chamado de encaixe induzido (Figura 2).

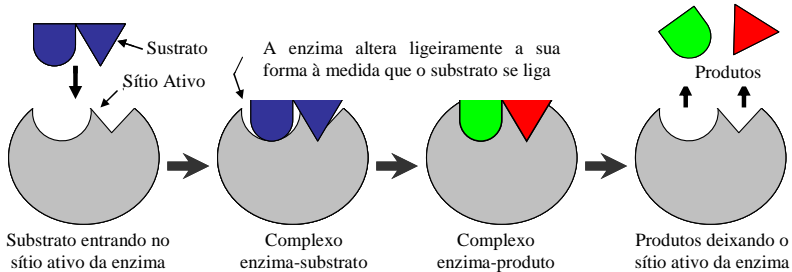
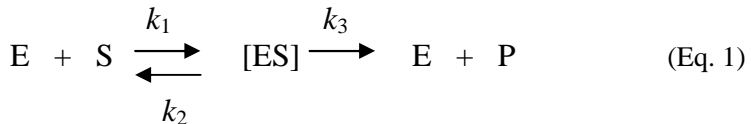


Figura 2. Diagramas que mostram a atividade enzimática através do modelo do encaixe induzido.

Para muitas enzimas, a velocidade de catálise v varia com a concentração do substrato $[S]$, conforme mostrado na Figura 3, onde v é definido como o número de moléculas de produto formado por segundo. Observa-se no gráfico que v é quase linearmente proporcional a $[S]$, quando $[S]$ é baixa; porém, em alta $[S]$, v é quase independente de $[S]$. Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Menten propuseram um modelo simples para explicar estas características cinéticas. Neste modelo, uma enzima (E) se combina com um substrato (S), para formar um complexo enzima-substrato (ES), o qual pode prosseguir para formar um produto (P), ou para se dissociar em E e S, de acordo com a equação 1.



A velocidade v de formação do produto é dada pela equação de Michaelis-Menten (equação 2):

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Eq. 2})$$

na qual v_{\max} é a velocidade quando a enzima está totalmente saturada com substrato, e K_M , a constante de Michaelis, é a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é metade da máxima ($v_{\max}/2$). Esta constante é característica de um substrato para uma enzima específica, fornecendo um parâmetro de especificidade entre substrato-enzima. A velocidade máxima, v_{\max} , é igual ao produto de k_3 pela concentração total da enzima. A constante cinética k_3 , chamada de número de renovação (*turnover number*), é o número de moléculas de substrato transformadas por unidade de tempo, em um único sítio catalítico, quando a enzima está totalmente saturada com substrato. Os números de renovação para a maioria das enzimas estão entre 1 e 10^4 por segundo (FERSHT, 1980; STRYER, 1996; LEHNINGER *et al.*, 2006).

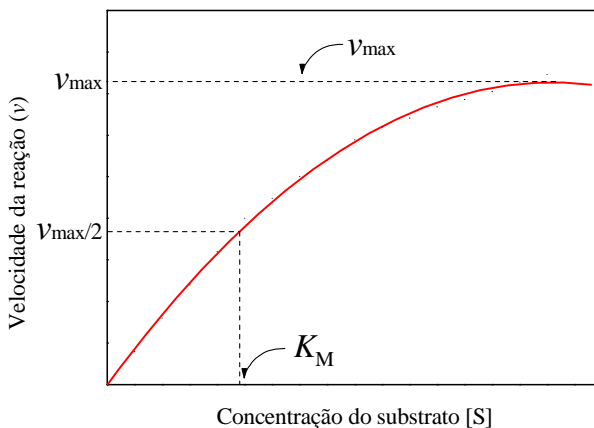


Figura 3. Gráfico da velocidade da reação em função da concentração do substrato, para uma enzima que obedeça à cinética de Michaelis-Menten (STRYER, 1996).

As enzimas são classificadas em grupos conforme o tipo de reações que catalisam. De acordo com a classificação proposta pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb>), as enzimas apresentam-se divididas em seis grupos, que estão listados a seguir:

1. Oxidoredutases: catalisam reações de oxidação e redução (ex.: peroxidase, lacase);

2. Transferases: realizam a transferência de grupos de um composto para o outro (ex.: dimetilaliltransferase);

3. Hidrolases: catalisam reações de hidrólise de ligações covalentes (ex.: urease);

4. Liases: catalisam a quebra de ligações covalentes pela eliminação de grupos funcionais, formando ligações duplas; ou catalisam a adição de grupos funcionais através de ligações duplas (ex.: carbonato desidratase);

5. Isomerases: facilitam reações de isomerismos ópticos e geométricos (ex.: maleato isomerase);

6. Ligases: realizam a união de duas moléculas associadas à hidrólise de uma ligação da adenosina trifosfato (ATP) (ex.: piruvato carboxilase).

1.2.1. Peroxidase

A enzima peroxidase encontra-se amplamente distribuída na natureza e pode ser facilmente extraída de células de várias plantas, fungos, animais e microorganismos, além de ser considerada termoestável. As fontes vegetais de peroxidase são inúmeras, dentre elas podem-se citar: pêssigo (*Prunus persica*), mandioca (*Manihot utilissima*), alcachofra (*Cynara scolymus L.*), batata doce (*Ipomoea batatas (L.) Lam.*), rabanete (*Armoracia rusticana*), abobrinha (*Cucurbita pepo*), jiló (*Solanum gilo*), vagem (*Phaseolus vulgaris*), entre outras (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002; VIEIRA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2006 A e B; FERNANDES *et al.*, 2007).

As peroxidases (E.C. 1.11.1.7) pertencem à classe das oxirredutases e catalisam reações de oxidação de vários substratos doadores de prótons, tais como: monofenóis, difenóis, polifenóis e aminofenóis, na presença de peróxido de hidrogênio. Muitas peroxidases são heme proteínas e possuem no seu sítio ativo um grupo Fe(III) protoporfirina IX (usualmente referido como “grupo heme”), conforme ilustrado na Figura 4.

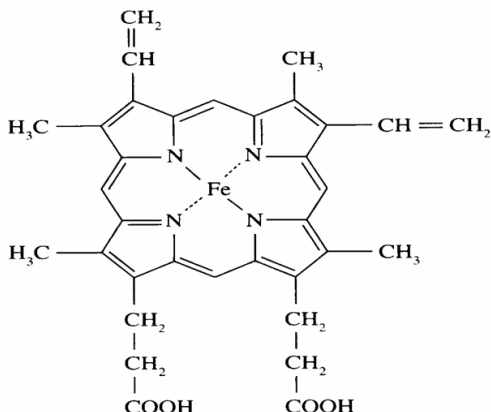
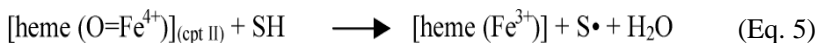
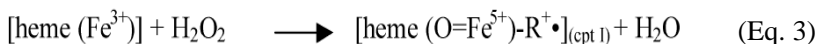


Figura 4. Grupo Fe(III) protoporfirina IX (“grupo heme”), sítio ativo de muitas enzimas peroxidases (VEITCH, 2004).

Estas enzimas apresentam um ciclo catalítico bastante complexo, mostrado de forma simplificada nas três etapas a seguir (ULIANA *et al.*, 2008):



A equação 3 envolve a oxidação do grupo prostético heme da peroxidase pelo peróxido de hidrogênio por dois elétrons, e a formação de um composto intermediário, no estado Fe^{5+} (Composto I), consistindo do ferro oxiferril ($\text{O}=\text{Fe}^{5+}$) e do cátion radical π porfirínico. Na equação 4, o composto intermediário (Fe^{5+}) formado sofre uma reação de redução pela transferência de um elétron do substrato doador SH (por exemplo, um fenol), formando composto intermediário, no estado de oxidação Fe^{4+} (Composto II). Um elétron adicional pode ser transferido, proveniente de uma segunda molécula do substrato SH (Equação 5), de forma que a enzima retorne a sua forma nativa (Fe^{3+}). Nas etapas 4 e 5, o substrato doador de elétrons (SH) é oxidado (RUZGAS *et al.*, 1996; FERAPONTOVA *et al.*, 2001; VEITCH, 2004; ULIANA *et al.*, 2008).

Existe um amplo interesse pelas peroxidases, devido às suas múltiplas aplicações nas indústrias de papel e celulose, de alimentos, em análises bioquímicas e tratamentos de resíduos, entre outras (REGALADO *et al.*, 2004). Além disso, há uma grande utilização destas enzimas em laboratórios de pesquisa, como por exemplo, em reações de síntese orgânica e na construção de biossensores. A utilização de materiais biológicos brutos como catalisador na construção destes bioeletrodos, em substituição a enzimas purificadas, tem recebido considerável atenção de pesquisadores. O uso de tecidos e extratos de vegetais oferece vantagens atrativas em relação às enzimas puras, tais como estabilidade, baixo custo e longo tempo de vida útil (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002).

1.2.2. Lacase

A lacase (EC 1.10.3.2) pertence à classe das oxirredutases e é uma enzima “multicobre” que catalisa a oxidação de uma variedade de compostos inorgânicos e aromáticos (particularmente fenóis) com a redução simultânea de oxigênio molecular à água (MAYER e STAPLES, 2002; DURÁN *et al.*, 2002; RIVA, 2006), como esquematizado na Figura 5. De acordo com a representação esquemática do ciclo catalítico da lacase, ocorre a oxidação de quatro moléculas de substrato para os radicais correspondentes e, concomitantemente, a eliminação de duas moléculas de água a partir da redução de uma molécula de oxigênio molecular.

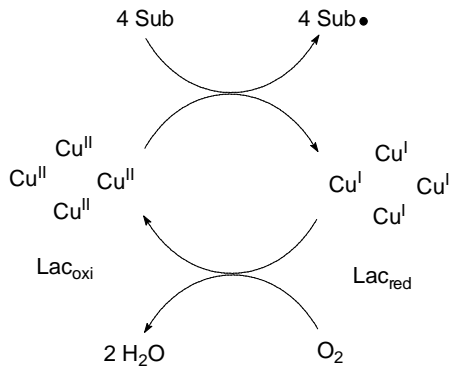


Figura 5. Representação esquemática do ciclo catalítico da lacase. Sub: substrato; Sub•: substrato oxidado radicalar (adaptado de RIVA, 2006).

Em geral, lacases possuem quatro átomos de cobre que desempenham um importante papel nos mecanismos catalíticos. Estes átomos são distribuídos em diferentes sítios de ligação e são classificados em três tipos, de acordo com características funcionais e espectroscópicas específicas (Figura 6). O cobre Tipo 1 ou azul (sítio mononuclear) está envolvido em captura e transferência de elétrons, portanto, é onde a oxidação do substrato acontece. Os cobres Tipo 2 e 3 (sítio trinuclear) estão envolvidos na ligação com o oxigênio, ou seja, são responsáveis pela redução do oxigênio molecular e liberação de água (DURÁN *et al.*, 2002; RIVA, 2006).

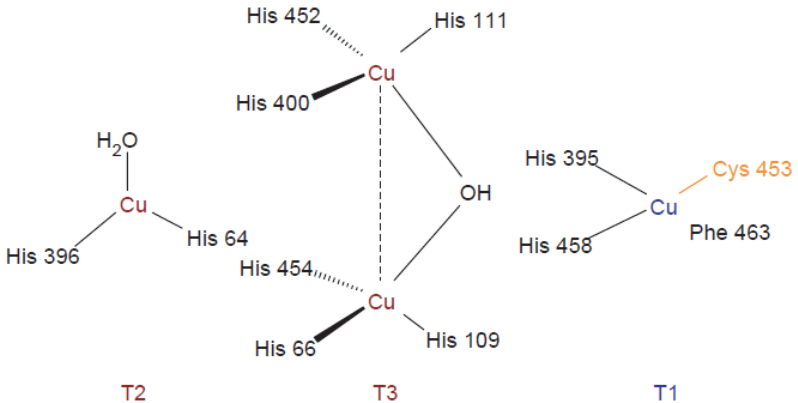


Figura 6. Representação estrutural do sítio ativo das lacases. Tipo 1 ou azul (T1); Tipo 2 (T2) e Tipo 3 (T3) (RIVA, 2006).

Também conhecidas como “enzimas azuis”, as lacases são obtidas de plantas superiores, fungos e bactérias, porém, as enzimas mais conhecidas são as provenientes de fungos (por exemplo, fungos de decomposição da madeira). Embora os centros de cobre sejam similares para todas as lacases, diferenças significativas são observadas nas propriedades termodinâmicas e cinéticas, em função de sua origem (MAYER e STAPLES, 2002; DURÁN *et al.*, 2002; RIVA, 2006).

As enzimas lacases são extensamente usadas nas indústrias de papel, tecidos, alimentos e cosméticos, bem como em áreas biotecnológicas, em especial, biorremediação de águas e solos contaminados (DURÁN e ESPOSITO, 2000; MINUSSI *et al.*, 2002; RIVA, 2006; COUTO e HERRERA, 2006; MOROZOVA *et al.*, 2007). Além destas aplicações, estas enzimas vêm sendo empregadas com

sucesso na construção de biossensores para determinação de compostos fenólicos (GOMES *et al.*, 2004; SANTHIAGO e VIEIRA, 2007; FRANZOI *et al.*, 2009 A e B).

1.3. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

As enzimas apresentam várias propriedades desejáveis, como descrito anteriormente, que as tornam potentes catalisadores para inúmeros processos de biotransformação, destacando-se o uso em indústrias farmacêuticas, químicas e de alimentos, além do seu emprego na construção de biossensores. Contudo, as enzimas estão sujeitas à perda de sua atividade por fatores químicos, físicos e/ou biológicos, durante sua utilização ou até mesmo estocagem. Deste modo, diferentes tipos de imobilização de enzimas têm sido desenvolvidos a fim de se obter biocatalisadores com atividade e estabilidade protegidas durante os processos em que são empregados. Além disso, as enzimas imobilizadas apresentam grandes vantagens em relação às enzimas livres, pois podem ser recuperadas e reutilizadas, e, assim, há um aumento no tempo de vida útil e diminuição dos custos das reações catalisadas por estas biomoléculas (WEETALL, 1975; GUILBAULT, 1984; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007).

As características das enzimas imobilizadas são controladas pelas propriedades das enzimas e pelo material usado como suporte. Desta maneira, o material empregado na imobilização deve ser criteriosamente escolhido para que seja possível a obtenção de um biocatalisador com desempenho superior. Recentemente, vários biopolímeros têm sido utilizados com essa finalidade, tais como alginato (DING *et al.*, 2008), quitosana (KRAJEWSKA, 2004; GUPTA e JABRAIL, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006 A, B e C) e quitina (KRAJEWSKA, 2004; FERNANDES *et al.*, 2007), pois são materiais versáteis e quimicamente inertes. Assim, a enzima imobilizada de maneira ideal deverá exibir uma atividade catalítica maior ou igual à enzima livre e, conseqüentemente, sem ocorrência de alterações estruturais, bem como modificações no seu sítio ativo.

Na literatura, encontram-se descritos diversos métodos de imobilização, utilizando diferentes suportes e/ou agentes reticulantes/ativadores. De modo geral, a imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em uma matriz insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através das ligações cruzadas, confinamento em géis ou em membranas poliméricas (WEETALL, 1975; GUILBAULT, 1984; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO

et al., 2007). A Figura 7 ilustra e classifica os principais métodos empregados na imobilização de enzimas.

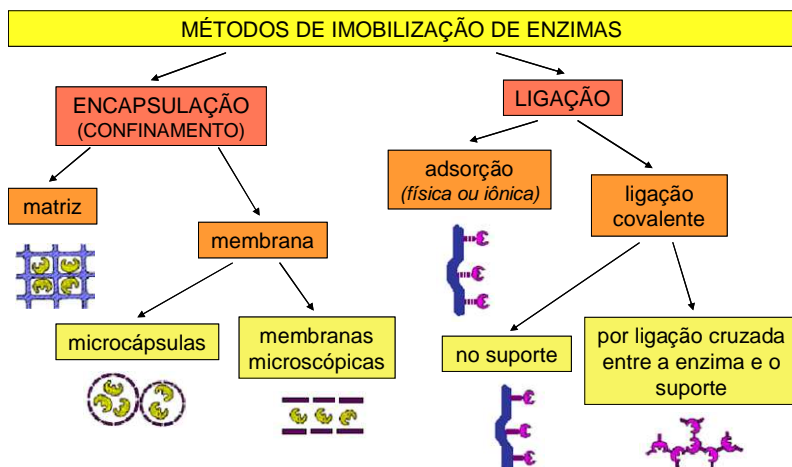


Figura 7. Métodos de imobilização de enzimas (adaptado de DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

A imobilização por adsorção é um método simples, rápido e baixo custo, sendo amplamente empregado. Este procedimento consiste na união entre a enzima e um suporte inerte através de ligações de baixa energia (interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas). Vários materiais podem ser utilizados para esse tipo de imobilização, tais como celulose, carvão, sílica-gel, resinas de troca iônica e argilominerais em geral. Contudo, uma das principais desvantagens deste método é a dessorção da biomolécula do suporte (GUILBAULT, 1984; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007).

A imobilização por ligação covalente ocorre entre os grupos reativos do suporte e os grupos funcionais não ativos da enzima (ex.: amino, hidroxila, ácidos carboxílicos). Em geral, este método envolve duas etapas: a ativação do suporte com um reagente específico (ex.: carbodiimida) e a adição da enzima para formação da ligação. Entretanto, deve-se tomar cuidado para não realizar a ligação através do centro ativo da enzima, o que ocasionaria perda da atividade da mesma. Já na imobilização por ligação cruzada, as moléculas de enzima ligam-se entre si por pontes intermoleculares, formando uma rede polimérica

tridimensional. Este método envolve a união das enzimas através de ligações covalentes, utilizando reagentes bi ou multifuncionais (ex.: glutaraldeído, glioxal). O resultado é uma imobilização eficiente e com boa estabilidade diante de variações de pH, temperatura e solventes (GUILBAULT, 1984; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007).

O confinamento da enzima em matriz polimérica ocorre durante o processo de reticulação de um polímero insolúvel. A rede polimérica forma espaços vazios, onde a enzima fica imobilizada. Apresenta como desvantagens, a perda de enzima pelos poros do polímero e dificuldade no transporte do substrato e do produto pelas paredes poliméricas. Já no confinamento em microcápsulas ou membranas microscópicas, a enzima não interage quimicamente com o suporte (ex.: acetato de celulose, policarbonato, colágeno), permanecendo praticamente recoberta pelo sistema, mantendo facilmente a atividade enzimática. A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não se liga ao polímero evitando, assim, uma possível desnaturação. Contudo, a difusão das espécies envolvidas no processo e a retenção de produtos no interior do sistema são algumas desvantagens deste método (GUILBAULT, 1984; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007).

1.3.1. Quitina

A quitina é o segundo mais abundante polissacarídeo de ocorrência natural, ficando atrás apenas da celulose, mas liderando em termos de taxa de reposição, que chega a ser duas vezes maior que da celulose (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). A quitina atua como invólucro protetor e material de suporte nos organismos em que ocorre. Este biopolímero é encontrado na matriz da estrutura esquelética de invertebrados, como artrópodes, anelídeos, moluscos e celenterados, em algas diatomáceas e nas paredes celulares de alguns fungos e insetos. É um polissacarídeo de cadeia linear constituída, quase exclusivamente, por unidades 2-acetamido-2-desoxi-*D*-glicopiranosas unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, conforme a estrutura mostrada na Figura 8-A. A quitina apresenta estrutura semelhante ao seu derivado, a quitosana (Figura 8-B), sendo essa constituída predominantemente de unidades 2-amino-2-desoxi-*D*-glicopiranosas. A quitosana é obtida a partir da desacetilação da quitina por processo de hidrólise alcalina, apresentando normalmente grau de desacetilação de 40 – 98%. Além disso, a quitosana apresenta solubilidade em soluções aquosas diluídas de ácidos, enquanto que a quitina corresponde a produtos muito mais

acetilados e insolúveis (MUZZARELLI *et al.*, 1986; KRAJEWSKA, 2004; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; KASAAI, 2008; MOURYA e INAMDAR, 2008).

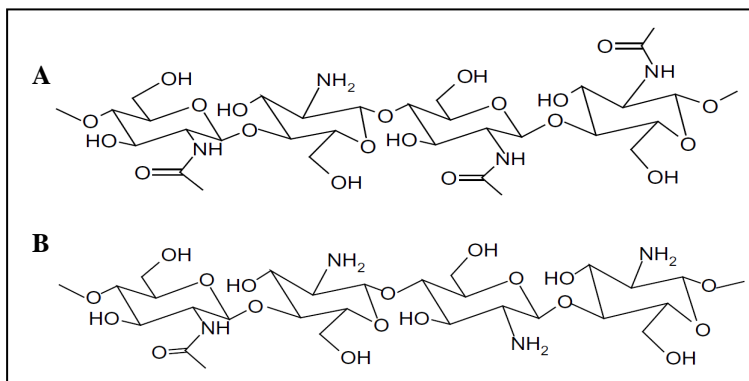


Figura 8. Estrutura química da quitina (A) e do seu derivado – quitosana (B).

A quitina e seus derivados são atualmente usados em várias áreas, tais como: tratamento de água, biomédica, farmacêutica, cosmética, biotecnológica, agrícola e indústrias de alimentos. A quitina apresenta propriedades materiais excelentes como biocompatibilidade, biodegradabilidade, alto poder de adsorção, estabilidade física e química, além de não ser tóxica e possibilitar modificações químicas na sua estrutura (FELSE e PANDA, 1999; KURITA, 2001; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; MIR, 2008 *et al.*; NAGAHAMA *et al.*, 2008; MOURYA e INAMDAR, 2008). Devido a estas diversas vantagens, este biopolímero tem chamado a atenção de pesquisadores para seu uso como suporte para imobilização de enzimas (FELSE e PANDA, 1999; KRAJEWSKA, 2004; FERNANDES *et al.*, 2007).

1.4. LÍQUIDOS IÔNICOS

Recentemente, uma nova classe de compostos, a dos líquidos iônicos (LIs), vem sendo empregada, com grande sucesso, em diversas reações orgânicas e organometálicas, processos de extração e eletroquímica (HOLBREY e SEDDON, 1999; DUPONT *et al.*, 2002 A; CONSORTI *et al.*, 2001). A aplicação destes líquidos tem ganhado notável espaço na química analítica, onde têm sido usados em separação e pré-concentração em cromatografias (HAN e ARMSTRONG, 2007),

e, especialmente, em eletroanalítica como eletrólito suporte ou como modificadores de sensores e biossensores (WEI e IVASKA, 2008; CHERNYSHOV *et al.*, 2008).

LIs ou sais fundidos, como também são conhecidos, podem ser definidos como eletrólitos compostos inteiramente por íons, são líquidos próximo a temperatura ambiente, apresentam fracas interações interiônicas, baixa energia de retículo cristalino, densidades elevadas, baixas temperaturas de fusão, negligenciável pressão de vapor, boa estabilidade química e térmica, habilidade catalítica e alta condutividade (HOLBREY e SEDDON, 1999; CONSORTI *et al.*, 2001; DUPONT, 2004).

Em virtude das características únicas dos LIs, especialmente por serem materiais com desprezível inflamabilidade, volatilidade e toxicidade, estes líquidos vêm atraindo a atenção de pesquisadores e indústrias interessados em tecnologias limpas, a conhecida “química verde”. Atualmente, os LIs estão sendo substituídos promissores para os solventes tradicionais, em muitas reações de síntese orgânica. A aplicação destes materiais vem crescendo, confirmando suas vantagens em relação aos solventes orgânicos convencionais, que são geralmente bastante voláteis e nocivos (EARLE e SEDDON, 2000).

Os LIs são formados por cátions orgânicos e ânions orgânicos ou inorgânicos, sendo que estas diversas combinações definem as propriedades físico-químicas destes compostos. Na Figura 9 são mostrados alguns exemplos de LIs formados pelo cátion 1,3-dialquilimidazólio e diferentes ânions, tais como tetrafluorborato, hexafluorofosfato, trifluormetilsulfonato, bis(trifluormetilsulfonil)-imida, etc. Estes compostos apresentam propriedades diferentes de acordo com cada combinação, conforme dados físico-químicos mostrados na Tabela 1 (HOLBREY e SEDDON, 1999; CONSORTI *et al.*, 2001; DUPONT, 2004).

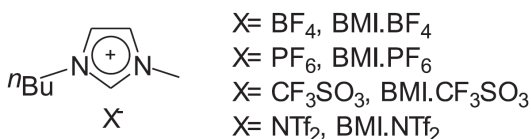


Figura 9. Exemplos de líquidos iônicos 1,3-dialquilimidazólio.

Tabela 1. Dados físico-químicos de alguns líquidos iônicos baseados em 1-alquil-3-metilimidazólio (DUPONT, 2004)

R	X	T _m (°C) ^a	η (mPa s) ^b	d (g.cm ⁻³) ^c	σ (mScm ⁻¹) ^d
Et	BF ₄	13	37	1,28	14
ⁿ Pr	BF ₄	-17	103	1,24	5,9
ⁿ Bu	BF ₄	–	180 (233)	1,21	3,5 (8,6)
ⁿ Bu	PF ₆	10	219 (312)	1,37	1,6 (6,5)
ⁿ Bu	AlCl ₄	–	(294)	1,23	(24,1)
ⁿ Bu	CF ₃ SO ₃	16	90	1,22	3,7
ⁿ Bu	N(Tf) ₂	-4	69	1,43	3,9
ⁿ Bu	CF ₃ CO ₂	–	73	1,21	3,2

R = cátion; X = ânion; ^a Ponto de fusão; ^b Viscosidade a 25 °C e entre parênteses a 30 °C; ^c Densidade a 25 °C; ^d Condutividade a 25°C e entre parênteses a 60 °C.

Dentre os vários LIs existentes, destacam-se aqueles derivados da combinação do cátion 1-*n*-butil-3-metilimidazólio (BMI⁺) com ânions fracamente coordenantes, tais como hexafluorofosfato (PF₆⁻) e bis(trifluormetilsulfonyl)imida (Tf₂N⁻). Esses LIs apresentam características como imiscibilidade em água (caráter hidrofóbico), atividade catalítica, ampla janela eletroquímica e alta estabilidade térmica (decomposição acima de 400 °C), sendo utilizados com êxito, por exemplo, como agentes estabilizadores de nanopartículas metálicas (ZHOU, 2005; MIGOWSKI e DUPONT, 2007; SCHEEREN *et al.*, 2008), bem como na modificação química de diferentes eletrodos, especialmente biossensores. Neste último caso, o objetivo principal é melhorar a sensibilidade e estabilidade destes dispositivos (ZHAO *et al.*, 2004; MALEKI *et al.*, 2006; CHERNYSHOV *et al.*, 2008; WEI e IVASKA, 2008; MUSAMEH e WANG, 2008).

1.5. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Nanotecnologia envolve o estudo, manipulação, criação e uso de materiais, dispositivos e sistemas tipicamente com dimensões menores que 100 nm. Recentemente, a nanotecnologia vem desempenhando um importante papel no desenvolvimento de sensores e biossensores, tendo em vista as características eletrônicas, magnéticas, ópticas e eletroquímicas únicas exibidas pelos nanomateriais. A construção de

eletrodos usando estes materiais em tamanho nanométrico tem apresentado resultados incríveis, tais como aumento na sensibilidade, estabilidade e velocidade de resposta destes dispositivos. (HERNÁNDEZ-SANTOS *et al.*, 2002; JIANRONG *et al.*, 2004; PUMERA *et al.*, 2007; CAMPBELL e COMPTON, 2009; ZHANG *et al.*, 2009).

Várias nanoestruturas têm sido investigadas para determinar suas propriedades e possibilidades de aplicação em biossensores, incluindo nanopartículas, nanotubos, nanofibras e nanofios. Dentre estes materiais, as nanopartículas (especialmente de ouro, prata e platina) são as mais extensivamente estudadas e usadas na fabricação de sensores e biossensores, como exposto nas revisões de Hernández-Santos *et al.* (2002), Campbell e Compton (2009) e Zhang *et al.* (2009) que tratam das propriedades e aplicação das nanopartículas metálicas em eletroanálise. Nestas revisões são destacadas algumas das inigualáveis propriedades dos materiais nanoparticulados, tais como aumento do transporte de massa, grande área superficial ativa e extraordinária atividade catalítica associada com seu tamanho controlado e composição.

A catálise é a mais importante aplicação química das nanopartículas metálicas e, por isso, vêm sendo amplamente estudada. Destacam-se as nanopartículas de metais de transição, especialmente metais preciosos, pois possuem espetaculares habilidades catalíticas, sendo empregadas em muitas reações orgânicas. Essas nanopartículas no meio reacional se comportam como catalisadores homogêneos convencionais, mas com a vantagem de serem recuperadas facilmente depois da reação. Da mesma forma, as nanopartículas de metais nobres têm sido usadas para catalisar reações bioquímicas, e esta capacidade pode ser proveitosamente empregada no desenvolvimento de biossensores (HERNÁNDEZ-SANTOS *et al.*, 2002; JIANRONG *et al.*, 2004; GUO e WANG, 2007).

Na síntese das nanopartículas metálicas, o controle do tamanho das partículas é um fator de grande importância, tendo em vista que estes materiais são apenas cineticamente estáveis e devem ser estabilizados para evitar aglomeração (coalescência) que leva a formação do metal (mínimo termodinâmico) e, portanto, perda das dimensões nanométricas. Métodos de proteção estérica e/ou eletrônica têm sido empregados para estabilização de nanopartículas de metais de transição (ZHOU, 2005; DUPONT, 2002 B). O grupo de pesquisa do Prof. Jairton Dupont tem demonstrado recentemente em seus estudos que os LIs derivados do 1-*n*-butil-3-metilimidazólio são excelentes

meios para preparação e estabilização de nanopartículas metálicas. De acordo com esses estudos, os LIs apresentam estrutura polimérica de interações fracas e são capazes de criar uma proteção estérica e eletrônica em torno da nanopartícula, evitando dessa forma a agregação (DUPONT, 2002 A e B; SCHEEREN *et al.*, 2003; MIGOWSKI e DUPONT, 2007). Além disso, é possível empregar diretamente a solução iônica contendo as nanopartículas dispersas em reações orgânicas e na modificação de sensores e biossensores, por exemplo. Assim, a combinação do LI com as nanopartículas de metais normalmente exibe um efeito sinérgico excelente que aumenta atividade e robustez do catalisador (ZHOU, 2005).

1.6. CATECOLAMINAS

As catecolaminas representam um grupo de aminas biogênicas, entre as quais estão a adrenalina, a noradrenalina e a dopamina, e têm importantes funções como neurotransmissores e hormônios. As catecolaminas são aminas derivadas do catecol (fenol orgânico formado por 2 grupos OH ligados ao benzeno) ao qual está ligado um grupo amina. As catecolaminas são sintetizadas na medula supra-renal, no cérebro e em algumas fibras nervosas simpáticas (GOODMAN *et al.*, 2003; AMORIM *et al.*, 2007; NALEWAJKO *et al.*, 2007; SHAI DAROVA *et al.*, 2008).

As catecolaminas exibem efeitos excitatórios e inibitórios do sistema nervoso periférico assim como ações sobre o sistema nervoso central (SNC), tais como a estimulação da respiração e aumento da atividade psicomotora. Podem também influenciar a taxa metabólica, tanto pela modulação da função endócrina como a secreção de insulina e pelo aumento da taxa de glicogenólise e a mobilização de ácidos graxos. Além disso, são marcadores importantes para o diagnóstico de muitas doenças, e também são extensamente usados no tratamento de asma bronquial, doença de Parkinson, infarto do miocárdio e cirurgia cardíaca (SZE PONIK *et al.*, 1997; KATZUNG, 1998; MICHAŁOWSKI e HAŁABURDA, 2001; GOODMAN *et al.*, 2003; NAGARAJA *et al.*, 2001; DEVLIN, 2007).

1.6.1. Adrenalina

A adrenalina, também denominada de epinefrina, é uma das mais conhecidas catecolaminas, pertence à família dos neurotransmissores químicos excitatórios e possui importante papel como hormônio

(MATEO e KOJLO, 1997; MICHAŁOWSKI e HAŁABURDA, 2001; BEITOLLAHI *et al.*, 2008). É biossintetizada principalmente na medula supra-renal e apresenta ações farmacológicas essenciais por excitar os receptores α - e β -adrenérgicos, atuando no sistema nervoso central, renal, hormonal e cardiovascular (VOET e VOET, 1995; GOODMAN *et al.*, 2003; GUYTON e HALL, 2006; FELIX *et al.*, 2006; BEITOLLAHI *et al.*, 2008).

Quimicamente, a adrenalina recebe a nomenclatura de 4-(1-hidroxi-2-(metilamino)etil)-1,2-benzenodiol, segundo a IUPAC, e apresenta estrutura química de acordo com a Figura 10. É uma amina simpatomimética (AMORIM *et al.*, 2007), isolada pela primeira vez em 1901 por Takamine e Aldrich, e sintetizada em 1904 por Stolz e Dalkin (HERNÁNDEZ *et al.*, 1998). A adrenalina foi o primeiro hormônio a ser obtido na forma cristalina, apresentando-se sob a forma de um pó de coloração branca, não apresenta odor e escurece gradualmente sob exposição à luz e ao ar (KOJŁO e CALATAYUD, 1995).

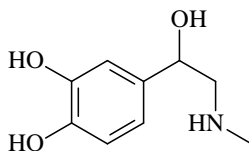


Figura 10. Estrutura química da adrenalina.

A adrenalina é um vasoconstritor potente e estimulante cardíaco (KATZUNG, 1998), sendo usada em medicina principalmente no tratamento de ataque do coração, asma bronquial, glaucoma e cirurgia cardíaca (MATEO e KOJLO, 1997; DEFTEREOS *et al.*, 1993; SOLICH *et al.*, 2000; GOODMAN *et al.*, 2003). Clinicamente, é a droga de escolha para o tratamento de emergências de reações alérgicas severas (anafilaxias), incluindo o choque anafilático, devido a picadas de insetos, comida, drogas, e outros alergênicos (SOLICH *et al.*, 2000; AMORIM *et al.*, 2007).

A determinação de adrenalina em fluidos biológicos e formulações farmacêuticas têm ganhado grande relevância científica e, conseqüentemente, recebido investimentos para novas e modernas pesquisas nesta área. Um grande número de métodos tem sido desenvolvido para a determinação desta catecolamina, empregando principalmente espectrofotometria (NEVADO *et al.*, 1996; ZHU *et al.*, 1997; SOROURADDIN *et al.*, 1998; SOLICH *et al.*, 2000;

NAGARAJA *et al.*, 2001), quimiluminescência (DEFTEREOS *et al.*, 1993; MICHAŁOWSKI e HAŁABURDA, 2001; LIU *et al.*, 2009), potenciometria (AMORIM *et al.*, 2007), cromatografia líquida de alta eficiência (FOTOPOULOU e IOANNOU, 2002; SABBIONI *et al.*, 2004; NALEWAJKO *et al.*, 2007), eletroforese capilar (WEI *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2007) e também técnicas eletroanalíticas usando diferentes sensores (MATEO e KOJLO, 1997; HERNÁNDEZ *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2002; SUN *et al.*, 2006; SHAI DAROVA *et al.*, 2008; BEITOLLAHI *et al.*, 2008; CHERNYSHOV *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2009; ZARE e NASIRIZADEH, 2010) e biossensores (SZEAPONIK *et al.*, 1997; LEITE *et al.*, 2003; FELIX *et al.*, 2006).

Porém, alguns destes métodos são muito dispendiosos, complicados, requerem longos tempos de execução e/ou exigem extrações/tratamentos prévios das amostras. Assim, biossensores de pasta de carbono apresentam-se como uma alternativa viável comparada a outros sensores eletroquímicos atualmente disponíveis para quantificação de adrenalina. Estes biossensores oferecem importantes vantagens, tais como baixo custo, simplicidade de construção, grande possibilidade de modificações, facilidade de renovação da superfície, boa seletividade e sensibilidade.

1.7. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

As técnicas eletroanalíticas são baseadas nas propriedades elétricas mensuráveis (corrente, potencial, carga, condutividade ou resistência) de um analito em solução quando este é submetido a uma diferença de potencial entre eletrodos em uma cela eletroquímica, com a finalidade de se obter informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas do analito. Estudos de processos de oxidação e redução em vários meios, de adsorção em superfícies e de mecanismo de transferência de elétrons, inclusive com a utilização de eletrodos modificados, exemplificam algumas das numerosas aplicações das técnicas eletroanalíticas. Além disso, essas técnicas podem ser adequadamente utilizadas na quantificação de espécies de interesse em diferentes áreas de estudo, tais como medicina, bioquímica, química ambiental e de alimentos. Dentre as vantagens apresentadas por essas técnicas estão: a possibilidade de realizar medidas diretamente na amostra (sem necessidade de etapas de pré-tratamento), o curto tempo necessário para a realização das análises e o baixo custo da instrumentação e dos reagentes utilizados, se comparados às técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Estas importantes vantagens têm

estimulado o uso intenso destas técnicas, bem como investimentos em pesquisa para desenvolvimento de métodos cada vez mais sensíveis (SKOOG *et al.*, 2002 e 2008; SOUZA *et al.*, 2003; HARRIS, 2005)

1.7.1. Voltametria

A voltametria compreende um grupo de métodos eletroanalíticos nos quais a informação sobre o analito é obtida através de medidas de corrente em função do potencial aplicado e em condições que estimulam a polarização de um eletrodo de trabalho. Em voltametria, um sinal de excitação de potencial variável é aplicado sobre uma cela eletroquímica contendo um eletrodo de trabalho. Esse sinal extrai uma resposta característica de corrente na qual se baseia o método. A cela é constituída de três eletrodos (eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar) imersos em uma solução contendo o analito e um eletrólito suporte (eletrólito não-reativo). O eletrodo de trabalho, cujo potencial varia linearmente com o tempo, tem suas dimensões pequenas para aumentar sua tendência de se tornar polarizado. O eletrodo de referência é geralmente um eletrodo de calomelano saturado ou de Ag/AgCl, cujo potencial permanece constante durante o experimento. E o eletrodo auxiliar, ou contra-eletrodo, que geralmente é um fio de platina, tem a função de conduzir eletricidade da fonte de sinal através da solução para o eletrodo de trabalho (WANG, 1994; SKOOG *et al.*, 2002 e 2008; HARRIS, 2005).

1.7.1.1. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroanalítica importante e extensamente aplicada. Embora essa técnica seja pouco utilizada em análises quantitativas (em comparação, por exemplo, à voltametria de onda quadrada), a VC é muito empregada para obtenção de informações sobre os processos eletroquímicos, por exemplo, sobre processos redox, detecção de intermediários de reações, observação e acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos. Geralmente, é a primeira técnica selecionada na investigação de um sistema que contém espécies eletroativas, uma vez que indica o potencial redox dessas espécies (SKOOG *et al.*, 2002 e 2008; HARRIS, 2005).

Na VC, o potencial elétrico aplicado no eletrodo de trabalho corresponde a uma onda triangular (Figura 11), ou seja, primeiramente a varredura de potencial é feita em uma direção e, em seguida, na outra,

enquanto a corrente é medida, constituindo um ciclo. Assim, a onda triangular produz a varredura no sentido direto e depois no sentido inverso, sendo chamado de potencial de inversão o ponto onde ocorre a reversão. Os potenciais de inversão devem ser escolhidos de maneira que se possa observar a oxidação ou redução, controlada por difusão, de uma ou mais espécies de interesse (SKOOG *et al.*, 2002 e 2008; HARRIS, 2005).

A varredura pode ser realizada na direção de potenciais mais negativos (varredura direta) ou na direção de potenciais mais positivos (varredura inversa), de acordo com o que se deseja observar. Para o estudo de agentes redutores, deve-se aplicar uma varredura inversa (sentido anódico), sendo processada a oxidação do composto, portanto a corrente de pico anódica (i_{pa}) é observada. No caso de agentes oxidantes, deve-se realizar uma varredura direta (sentido catódico) para a redução do composto, sendo obtida uma corrente de pico catódica (i_{pc}). A curva voltamétrica obtida pela variação da corrente (eixo y) vs a variação de potencial (eixo x) representa o voltamograma cíclico (Figura 12) (SKOOG *et al.*, 2002 e 2008; HARRIS, 2005).

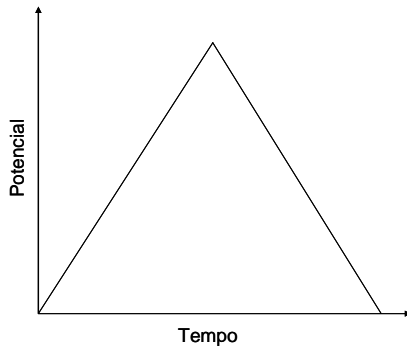


Figura 11. Sinal de excitação da voltametria cíclica.

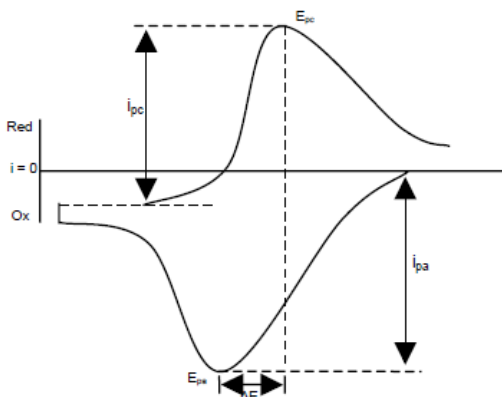


Figura 12. Voltamograma cíclico.

1.7.1.2. Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada (VOQ) é uma técnica de pulso que oferece vantagens como maior intensidade de sinal, melhor resolução do pico, medidas mais rápidas e maior sensibilidade, podendo seu limite de detecção ser comparado ao de técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Além disso, a análise dos parâmetros característicos desta técnica permite a avaliação mecanística e cinética dos processos eletroquímicos. Neste tipo de voltametria a medida de corrente é realizada com velocidades de varredura superiores a 100 mV s^{-1} , e as medidas de corrente são feitas apenas ao final do pulso de potencial, onde a corrente capacitiva já está minimizada (SKOOG *et al.*, 2002 e 2008; SOUZA *et al.*, 2003; HARRIS, 2005).

Na VOQ, a forma da curva de corrente *vs.* potencial é proveniente da aplicação de potenciais de altura ΔE_s (amplitude do pulso de potencial), que varia de acordo com uma escada de potencial de largura E_s (altura do degrau) e período τ (duração do pulso). O perfil da variação de potencial na VOQ está representado na Figura 13 e consiste na superposição de uma onda quadrada a uma função rampa escalonada em degraus. Durante cada pulso catódico, o analito se reduz na superfície do eletrodo, e durante o pulso anódico, o analito reduzido volta a se oxidar. No ponto 1, os elétrons fluem do eletrodo para o analito, e no ponto 2 na direção inversa. As correntes são medidas ao final dos pulsos diretos e reversos e o sinal é obtido como uma

intensidade da corrente resultante (Δi) de forma diferencial (Figura 14), ou seja, como as duas correntes têm sinais opostos, sua diferença é maior que qualquer uma das correntes em separado (SKOOG *et al.*, 2002 e 2008; SOUZA *et al.*, 2003; HARRIS, 2005).

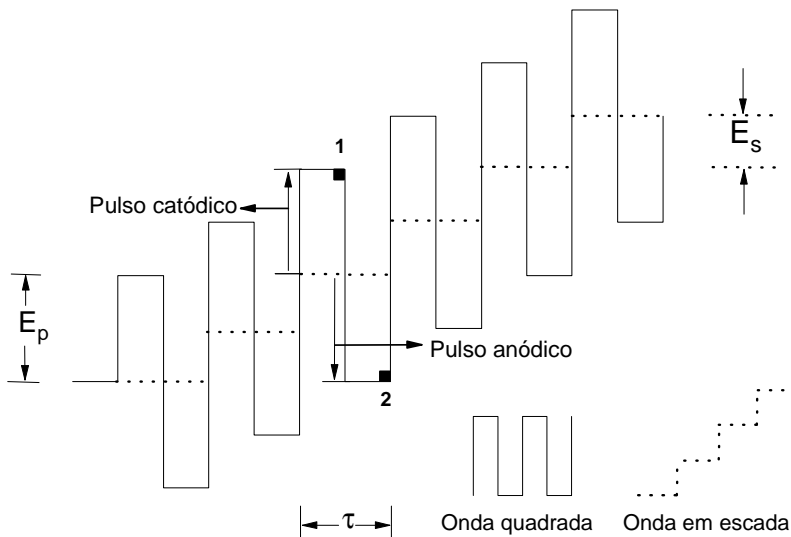


Figura 13. Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada (adaptado de HARRIS, 2005).

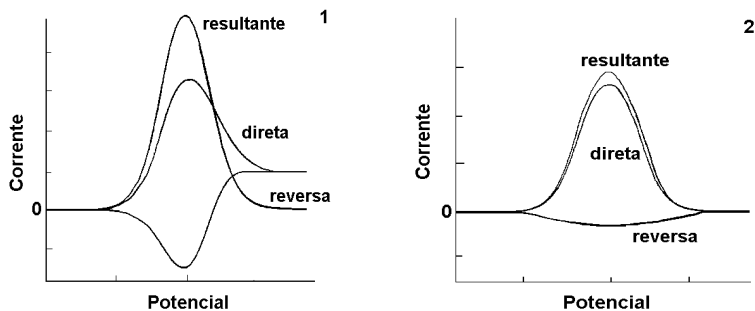


Figura 14. Voltamogramas de onda quadrada (1) processo redox de um sistema reversível e (2) processo redox de um sistema irreversível (SOUZA *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver e aplicar novos biossensores para a determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Biossensor contendo líquido iônico e peroxidase imobilizada em quitina modificada líquido iônico

- Obter um extrato de milho para utilização como fonte de enzima peroxidase;
- Determinar a atividade da peroxidase por método espectrofotométrico;
- Modificar quimicamente o biopolímero quitina com carbodiimida e glioxal;
- Imobilizar a enzima em quitina quimicamente modificada;
- Construir biossensores de pasta de carbono contendo peroxidase imobilizada em quitina quimicamente modificada e diferentes aglutinantes (Nujol e LI);
- Investigar parâmetros experimentais (porcentagem de LI; concentração de enzima; parâmetros de voltametria de onda quadrada; eletrólito suporte e pH) utilizando técnicas voltamétricas para otimização dos biossensores;
- Aplicar os biossensores desenvolvidos na determinação de adrenalina em amostras de formulações farmacêuticas, usando voltametria de onda quadrada;
- Comparar o teor de adrenalina em produtos farmacêuticos determinado utilizando-se os biossensores propostos e um método padrão.

2.2.2. Biossensor contendo lacase e nanopartículas de platina em líquido iônico

- Construir um biossensor de pasta de carbono contendo microcápsulas de lacase e nanopartículas de platina em LI (Pt-BMI.PF₆);

- Investigar parâmetros experimentais (porcentagem de nanopartículas de platina em LI; porcentagem de enzima; parâmetros de voltametria de onda quadrada; eletrólito suporte e pH) utilizando técnicas voltamétricas para otimização do biossensor;
- Aplicar o biossensor desenvolvido na determinação de adrenalina em amostras de formulações farmacêuticas;
- Comparar o teor de adrenalina em produtos farmacêuticos determinado utilizando-se o biossensor proposto e um método padrão.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. INSTRUMENTAÇÃO

O extrato enzimático foi obtido utilizando-se um liquidificador Black & Decker modelo IB900 e uma centrífuga Hitachi modelo Himac CR 20B2, respectivamente, para homogeneização e centrifugação do material vegetal.

Um espectrofotômetro Micronal modelo B572 e cubeta de quartzo (1,00 cm de caminho óptico) foram usados para a determinação da atividade do extrato enzimático.

As quantificações de adrenalina pelo método comparativo (método padrão) foram realizadas em um espectrofotômetro UV-vis Hewlett-Packard (Boise, ID, USA), modelo 8452A, com cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico.

Um banho ultra-sônico Unique 1400A foi utilizado para auxiliar no preparo de soluções.

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT12 (Eco Chemie, The Netherlands), conectado a um *software* de processamento de dados (GPES, versão 4.9.006, Eco Chemie). Para execução das análises utilizou-se uma cela de vidro (capacidade máxima aproximada de 15 mL) sem compartimento divisório e com tampa de Teflon provida de orifícios circulares para encaixe dos eletrodos e adição das soluções. Foi utilizado um sistema de três eletrodos: o biossensor desenvolvido no laboratório aplicado como eletrodo de trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrodo de referência e uma placa de platina ($0,5 \text{ cm}^2$) como eletrodo auxiliar.

As caracterizações morfológicas dos biossensores desenvolvidos e de um eletrodo de pasta de carbono não modificado foram realizadas no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As pastas foram colocadas sobre uma superfície de carbono contendo uma fita de dupla face e em seguida foram cobertas com uma camada de ouro para formar um filme condutor utilizando um metalizador (Blazers SCD 005, Liechtenstein). As pastas foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) PHILIPS, modelo XL30, utilizando detector de elétrons secundários.

3.2. REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS

Reagentes de grau analítico foram obtidos comercialmente e usados no preparo de soluções, sem tratamento adicional para purificação. Todas as soluções foram preparadas usando-se água destilada e deionizada.

Soluções tampão acetato (pH 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5) e fosfato (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0) foram preparadas nas concentrações de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando reagentes obtidos da Vetec.

Extrato bruto de milho verde foi usado como fonte de peroxidase. O milho verde foi obtido de um supermercado de Florianópolis – SC, e o extrato deste vegetal foi armazenado em refrigerador a 4°C .

Na determinação da atividade enzimática da peroxidase do extrato de milho foi utilizada uma solução de guaiacol $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ preparada mediante diluição de 0,14 mL deste reagente (Aldrich, 98%) em um balão volumétrico de 25 mL com solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Também para esta análise, uma solução estoque de peróxido de hidrogênio $9,8 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diluindo 1,0 mL desse reagente (Vetec, 30%) em um balão volumétrico de 100 mL com solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Esta solução estoque foi armazenada em geladeira para uso durante o trabalho. Uma solução de trabalho de peróxido de hidrogênio $9,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diariamente a partir da diluição de 1,0 mL da solução estoque em balão volumétrico de 10 mL, com tampão fosfato pH 7,0.

Quitina purificada em pó, apresentando granulometria inferior a 60 mesh e grau de acetilação de 89,5%, foi adquirida da Aldrich e usada como suporte para imobilizar a enzima vegetal. Glioxal e carbodiimida foram obtidos da Sigma e utilizados na modificação química da quitina.

Microcápsulas de lacase (Denilite II Base; 800 U g^{-1}) foram obtidas da Novozymes, sendo esta enzima produzida por microorganismos geneticamente modificados (*Aspergillus oryzae*).

Para construção dos biossensores de pasta de carbono foi usado pó de grafite (Acheson 38) da Fisher Scientific e Nujol (óleo mineral purificado) obtido da Aldrich. O LI hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMI.PF₆) e as nanopartículas de platina dispersas em LI BMI.PF₆ (Pt-BMI.PF₆) foram sintetizados e caracterizados no Laboratório de Catálise Molecular (LAMOCA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Jairton Dupont, e fornecidos para o presente trabalho.

Solução estoque de adrenalina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diariamente pela dissolução de 0,0018 g deste reagente (Sigma) em

balão volumétrico de 10 mL com tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5 / 7,0).

Amostras de soluções injetáveis de adrenalina (1 mg mL^{-1}) foram obtidas no Hospital da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), na cidade de Florianópolis – SC, e foram analisadas empregando-se os biossensores propostos e um método padrão (espectrofotométrico).

3.3. METODOLOGIA

3.3.1. Biossensor contendo líquido iônico e peroxidase imobilizada em quitina modificada

3.3.1.1. Obtenção do extrato enzimático

Após descascar, limpar e degranar as espigas de milho verde (*Zea mays* L.) obtido no supermercado local, uma massa de 25,0 g de grãos deste vegetal foi homogeneizada em um liquidificador juntamente com 100 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). O extrato bruto vegetal (homogenato) foi rapidamente filtrado em quatro camadas de gaze e posteriormente centrifugado a 18000 rpm por 5 min a uma temperatura de $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (OLIVEIRA *et al.*, 2006 A, B e C; FERNANDES *et al.*, 2007). A solução sobrenadante, quando necessário, passou por filtração em holder com membrana $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore, Bedford, USA). O extrato enzimático foi armazenado em frascos âmbar, sob refrigeração, e usado como fonte da enzima peroxidase para a construção dos biossensores.

3.3.1.2. Determinação da atividade enzimática da peroxidase

A atividade da peroxidase no extrato de milho foi determinada medindo-se a variação de absorbância (comprimento de onda = 470 nm) do tetraguaiacol formado na reação enzimática (Figura 15). Nessa determinação foram usados 0,2 mL da solução sobrenadante do extrato vegetal, 2,7 mL de guaiacol $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e 0,1 mL de peróxido de hidrogênio $9,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Após a homogeneização dessas soluções, em triplicata, foi acompanhada espectrofotometricamente a absorbância do tetraguaiacol durante cerca de 2 min, a temperatura ambiente.

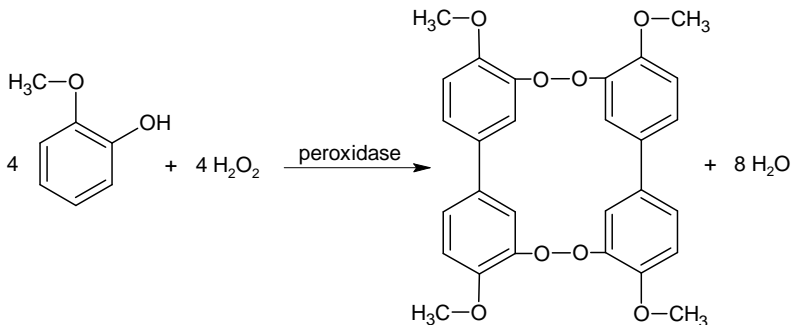


Figura 15. Reação entre guaiacol e peróxido de hidrogênio, catalisada pela enzima peroxidase.

A atividade enzimática – unidade mL^{-1} – definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto, sob as condições mencionadas, foi determinada pela equação 6 (VIEIRA *et al.*, 1998, 2003; MIKKELSEN e CORTÓN, 2004; OLIVEIRA, 2007).

$$A \text{ (unidade } mL^{-1}) = \frac{\Delta Abs.1000}{\Delta t(s).V(mL)} \quad (\text{Eq. 6})$$

A = atividade da enzima (unidade mL^{-1})

ΔAbs = variação da absorbância ($\lambda = 470 \text{ nm}$)

V = volume do extrato enzimático (mL)

Δt = variação do tempo (s)

3.3.1.3. Reticulação da quitina

A quitina foi usada como suporte para a imobilização da peroxidase obtida do milho, após modificação química com os reagentes glioxal (GUPTA e JABRAIL, 2006; MARTINEZ *et al.*, 2007) e carbodiimida (CHIOU e WU, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006 B). Primeiramente, uma alíquota de 1,0 mL de solução de glioxal 4,0% (v/v) preparada em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) foi transferida sobre uma massa de 1,0 g de quitina em pó e manualmente misturada por 1 min. Após permanecer em repouso por 4 h, em temperatura ambiente, a quitina foi filtrada e lavada com solução tampão fosfato (pH 7,0) para remover o excesso de glioxal e, na sequência, foi secada em um dessecador contendo sílica, sob

temperatura ambiente.

À quitina previamente reticulada com glioxal, adicionou-se uma alíquota de 30,0 mL de solução de carbodiimida $3,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, preparada em solução tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), deixando-se sob agitação mecânica por cerca de 30 min, a temperatura ambiente. Em seguida, a quitina foi filtrada e lavada com solução tampão de fosfato pH 7,0 para remover o excesso de carbodiimida. A quitina quimicamente modificada foi secada a temperatura ambiente e estocada para subsequente utilização como suporte para imobilização de enzimas.

3.3.1.4. Imobilização da peroxidase em quitina modificada

A quitina quimicamente modificada, de acordo com o procedimento descrito anteriormente, foi utilizada como suporte para imobilização da enzima peroxidase do extrato de milho verde. Foram adicionadas alíquotas de 35 a 250 μL do extrato de milho (aproximadamente 300 a 2000 unidades de peroxidase) sobre 0,02 g de quitina modificada, individualmente. Esses materiais foram cuidadosamente homogeneizados durante cerca de 2 min e, na sequência, foram secados a temperatura ambiente. Posteriormente, a peroxidase imobilizada na quitina foi utilizada para construção dos biossensores.

3.3.1.5. Construção dos biossensores

Três tipos de biossensores contendo peroxidase de milho imobilizada em quitina quimicamente modificada e diferentes materiais aglutinantes foram construídos do seguinte modo:

- *Biossensor I* (Nujol:BMI.PF₆; 100:0; %, m/m): 20,0 mg de quitina reticulada contendo 1500 unidades de peroxidase (10%, m/m) foram misturados com 140,0 mg de grafite em pó (70%, m/m) em um almofariz durante 20 min para assegurar a dispersão uniforme da enzima. Na sequência, 40,0 mg de Nujol (20%, m/m) foram adicionados a este pó e misturados por cerca de 20 min para obter a pasta final (7,5 unidades de peroxidase mg^{-1} de pasta de carbono). Esta pasta de carbono modificada foi embutida na ponta de uma seringa plástica de 1,0 mL (1,0 mm de diâmetro interno) e um fio de cobre (0,4 cm x 10,0 cm) foi inserido para obtenção do contato elétrico;

- *Biossensor II* (Nujol:BMI.PF₆; 50:50%, m/m): este biossensor foi construído de acordo com o método descrito para o *Biossensor I*, porém

foi usado como aglutinantes 20,0 mg de Nujol (10%, m/m) e 20,0 mg de LI BMI.PF₆ (10%, m/m);

▪ *Biossensor III* (Nujol: BMI.PF₆; 0:100%, m/m): este biossensor também foi construído conforme o procedimento descrito acima, porém somente LI foi incorporado como aglutinante, sendo usado 40,0 mg de BMI.PF₆ (20%, m/m).

3.3.1.6. Medidas eletroquímicas

As medidas voltamétricas foram realizadas de acordo com o seguinte método: uma alíquota de 10,0 mL de solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0) contendo 9,69x10⁻⁵ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio foi transferida para uma célula eletroquímica, e, em seguida, sucessivas adições de solução padrão de adrenalina ou amostras de formulações farmacêuticas foram feitas com a utilização de um micropipetador. Os voltamogramas cíclicos foram realizados em intervalo de potencial de +0,20 a -0,50 V, com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. As medidas de voltametria de onda quadrada foram obtidas aplicando varreduras de potencial entre +0,20 e -0,60 V, com frequência de 10–100 Hz, amplitude de pulso de 10–100 mV e incremento de 1,0–7,0 mV, após adições sucessivas do analito. Todos os potenciais foram registrados vs. Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl), após um tempo de agitação de 60 s (suficiente para homogeneizar a solução), e sob temperatura ambiente.

3.3.2. Biossensor contendo lacase e nanopartículas de platina em líquido iônico

3.3.2.1. Construção dos biossensores

Os biossensores foram construídos através da homogeneização manual de 40,0 mg de microcápsulas de lacase (20%, m/m) e 100,0 mg de grafite em pó (50%, m/m) em um almofariz durante 20 min para assegurar a dispersão uniforme da enzima. Subsequentemente, 30,0 mg de Nujol (15%, m/m) e 30,0 mg de nanopartículas de platina dispersas em LI (Pt-BMI.PF₆) (15%, m/m) foram adicionadas ao pó de grafite contendo enzima e misturados por cerca de 20 min para produzir a pasta final. A pasta de carbono modificada resultante foi embutida em uma seringa plástica de 1,0 mL (1,0 mm de diâmetro interno) e um fio de cobre (0,4 cm x 10,0 cm) foi inserido para obtenção do contato elétrico externo.

O biossensor sem nanopartículas de platina foi preparado de acordo com o mesmo procedimento, substituindo Pt-BMI.PF₆ por somente LI BMI.PF₆.

O EPC não modificado foi preparado de forma similar através da homogeneização manual de grafite em pó e Nujol em um almofariz com auxílio de um pistilo.

Os biossensores construídos foram estocados em local seco, a temperatura ambiente, quando não estavam sendo utilizados.

3.3.2.2. Medidas eletroquímicas

As medidas de voltametria foram realizadas de modo similar ao descrito anteriormente (item 3.3.1.6.). Contudo, nesta parte do trabalho, a solução tampão fosfato pH 6,5 foi utilizada como eletrólito suporte. Os voltamogramas cíclicos foram registrados na faixa de potencial entre -0,6 e +0,4 V, e para as medidas de voltametria de onda quadrada foram realizadas varreduras de potencial entre -0,5 e 0,0 V.

3.3.3. Preparação das amostras e determinação de adrenalina

Amostras de adrenalina injetável, contendo bissulfito de sódio (NaHSO₃) como conservante, foram analisadas após passar por um simples pré-tratamento. As amostras foram apropriadamente diluídas em solução tampão acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 4,0) e, subsequentemente, borbulhadas com nitrogênio durante cerca de 5 min. Este período foi suficiente para remover a interferência do bissulfito sob a forma de H₂SO₃ (SO_{2(g)} + H₂O_(l)) (FELIX *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2007). Estas amostras de adrenalina foram quantificadas usando os biossensores propostos e um método espectrofotométrico padrão.

O método de adição de padrão foi usado para determinação de adrenalina em amostras de formulações farmacêuticas, através de técnica eletroanalítica. Alíquotas das amostras previamente preparadas foram transferidas para a célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte (e peróxido de hidrogênio, quando necessário) e quantificadas usando voltametria de onda quadrada, após sucessivas adições de solução padrão de adrenalina. Todas as medidas foram executadas em triplicata.

Um método de espectrofotometria UV para determinação de adrenalina recomendado pela Farmacopéia (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007) foi usado para comparação com os resultados analíticos obtidos usando os biossensores propostos. De acordo com

esse método padrão, soluções de adrenalina em presença de ácido clorídrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ apresentam uma absorvância máxima em 280 nm, com absorvidade molar situada entre 2600 e 2800 $\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Para as amostras de formulações farmacêuticas (adrenalina injetável) analisadas neste trabalho, a quantificação espectrofotométrica de adrenalina foi feita através do método de padronização externa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. BIOSSENSOR CONTENDO PEROXIDASE IMOBILIZADA EM QUITINA MODIFICADA E LÍQUIDO IÔNICO

4.1.1. Estudo da atividade e estabilidade da peroxidase

O extrato vegetal enzimático foi obtido de milho verde (*Zea Mays* L.) e utilizado como fonte da enzima peroxidase. A atividade da peroxidase foi investigada por espectrofotometria em comprimento de onda de 470 nm, acompanhando-se a absorvância do tetraguaiacol formado na reação enzimática, como demonstrado anteriormente na Figura 15.

De acordo com o gráfico da atividade enzimática (Figura 16), pode-se calcular a atividade da peroxidase através da Equação 6 (mostrada anteriormente), utilizando a parte linear do gráfico, obtendo-se um valor de atividade da peroxidase igual a 8.010 unidades por mililitro do extrato de milho.

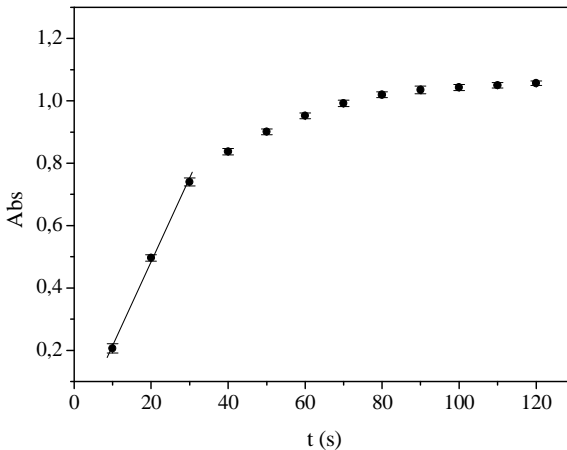


Figura 16. Determinação da atividade enzimática da peroxidase.

De acordo com a literatura (LOOMIS, 1969; FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002; OLIVEIRA, 2007), o escurecimento dos tecidos vegetais está relacionado com as reações entre a enzima polifenol oxidase ou peroxidase e os compostos fenólicos naturais presentes nesses tecidos. Este processo aliado à oxidação promovida

pelo oxigênio do ar são os responsáveis pela diminuição da atividade enzimática dos extratos vegetais brutos no decorrer do tempo.

Com o objetivo de acompanhar a estabilidade da peroxidase do extrato bruto de milho verde armazenado em refrigerador (4 °C), um estudo da atividade enzimática foi realizado. A estabilidade da enzima foi investigada durante 20 dias, apresentando diminuição gradual dos valores de atividade no decorrer deste período, conforme apresentado na Figura 17. Por este motivo, preferiu-se sempre utilizar o extrato preparado recentemente para a construção dos eletrodos e, além disso, assegurou-se melhor conservação da atividade enzimática através de imobilização.

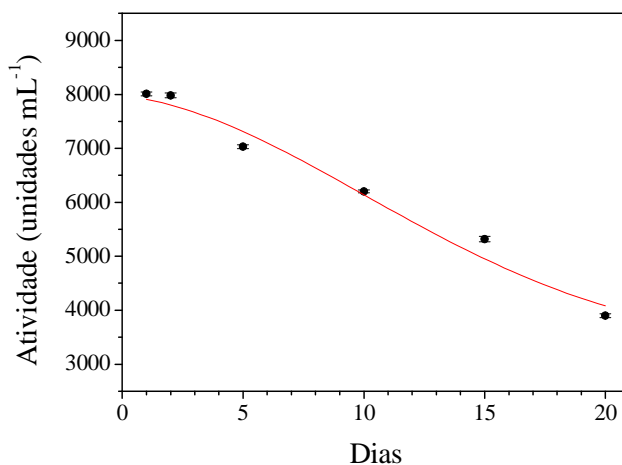


Figura 17. Estudo da estabilidade da peroxidase do extrato de milho verde armazenado em refrigerador (4 °C).

4.1.2. Quitina quimicamente modificada e imobilização da peroxidase

A quitina (Figura 18-A) é estruturalmente semelhante à celulose, mas é um amino polissacarídeo com grupos acetamida nas posições C-2 no lugar de grupos hidroxila. Além da sua estrutura polissacarídica única, a presença de grupos amino na quitina é altamente vantajosa por apresentar distintas funções biológicas disponíveis para realizar reações de modificação de sua estrutura química. Desta forma, a quitina pode apresentar um potencial de aplicação muito mais amplo que celulose em muitos campos da ciência e tecnologia (KURITA, 2001; MIR *et al.*,

2008).

As características da enzima e do suporte para imobilização são as principais responsáveis pela eficácia e propriedades da enzima imobilizada. A quitina é um material suporte excelente para imobilização de enzimas por causa de suas várias características desejáveis, incluindo hidrofiliabilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e estabilidade físico-química. Além disso, este biopolímero é suscetível à modificação química devido aos grupamentos amino e hidroxila que possibilitam a formação de ligação covalente com a enzima (KURITA, 2001; ZENG e ZHENG, 2002; MIR *et al.*, 2008).

A Figura 18 apresenta um esquema proposto para a imobilização da peroxidase de milho em quitina (A) modificada quimicamente com glioxal (B) e carbodiimida (C). O glioxal foi utilizado como agente reticulante, pois possui propriedades bifuncionais que resultam em reações com os grupos amino. Inicialmente, o glioxal reage com os grupos NH_2 disponíveis da quitina (aproximadamente 10,5%), levando a formação de uma rede polimérica, na qual a enzima peroxidase pode ser aprisionada entre os interstícios formados. Além disso, existe a possibilidade da enzima ligar-se em uma das extremidades livres do glioxal, ou seja, este reagente induz a formação de bases de Schiff entre seus grupos aldeídicos livres e grupos amino das moléculas de peroxidase. A adição subsequente da carbodiimida é utilizada como um agente ativador, o qual reage preferencialmente com os grupos hidroxila da quitina. Após a ativação, ocorre a formação de ligação covalente entre o suporte e o grupo amino da peroxidase. Sugere-se que a enzima peroxidase (D) seja covalentemente imobilizada (E) e também fique retida no espaço intersticial do biopolímero modificado, promovendo alta estabilidade, sem causar inativação enzimática.

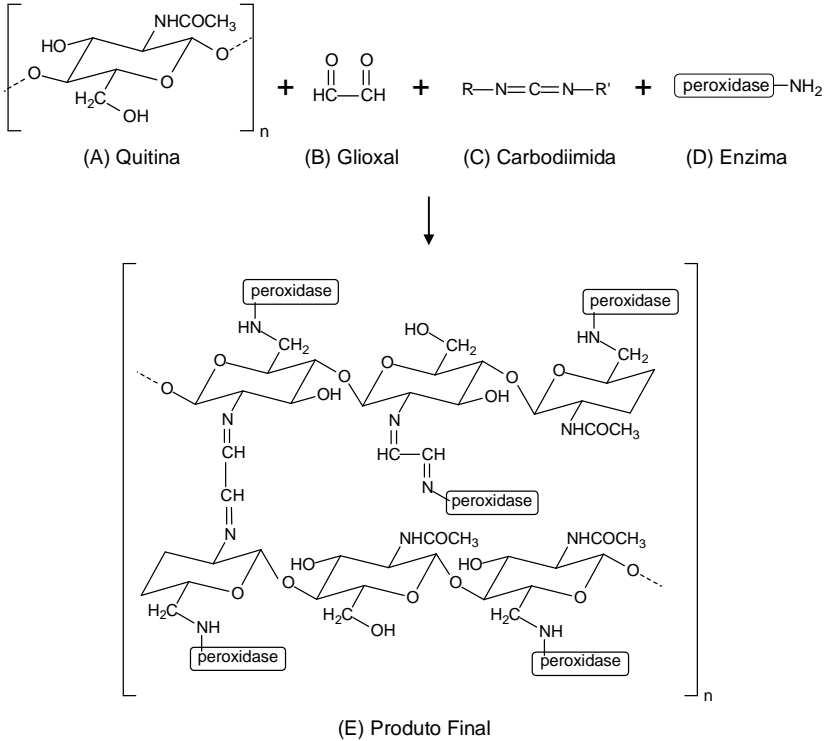


Figura 18. Esquema proposto para imobilização da peroxidase em quitina quimicamente modificada.

Conforme relatado previamente por Gupta e Jabrail (2006) em um estudo utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV), a reticulação de microesferas de quitosana utilizando glutaraldeído ou glioxal confere à superfície deste biopolímero um aspecto finamente rugoso. A Figura 19 mostra imagens de MEV de quitina em pó antes (A) e após modificação química (B). Pode-se observar que a morfologia das partículas de quitina foi alterada após reticulação, apresentando uma superfície significativamente mais enrugada em comparação à aparência do suporte que não recebeu nenhum tratamento, conforme descrito por Gupta e Jabrail (2006) no estudo com quitosana (estrutura similar a quitina). Esta informação indica que as reações de modificação deste suporte foram realizadas de forma eficiente.

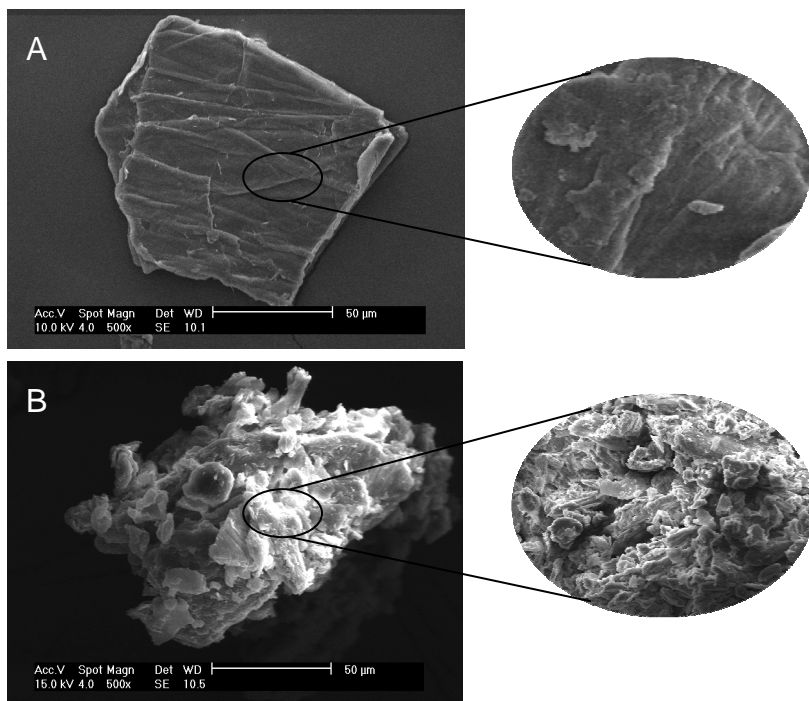


Figura 19. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de quitina em pó antes (A) e após modificação química (B).

4.1.3. Morfologia dos eletrodos

De acordo com o descrito na literatura (LIU *et al.*, 2005; MALEKI *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007; FRANZOI *et al.*, 2009 A; FERNANDES *et al.*, 2009), a morfologia das pastas de carbono diferem em relação aos tipos de aglutinantes utilizados na construção dos eletrodos.

A Figura 20 apresenta imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biossensores contendo (A) Nujol e (B) LI BMI.PF₆. Podem-se observar características distintas na morfologia dos eletrodos estudados. O biossensor construído de modo tradicional, usando Nujol como aglutinante (Figura 20-A), apresentou uma superfície composta por flocos de carbono irregulares e isolados. Por outro lado, o biossensor contendo LI (Figura 20-B) exibiu uma superfície mais uniforme, com melhor compactação da pasta de carbono, possivelmente em razão da alta viscosidade do BMI.PF₆.

Em adição, o LI apresenta outras vantagens quando empregado em biossensores, podendo-se destacar a facilitação na transferência de elétrons na superfície destes eletrodos (LIU *et al.*, 2005; MALEKI *et al.*, 2006).

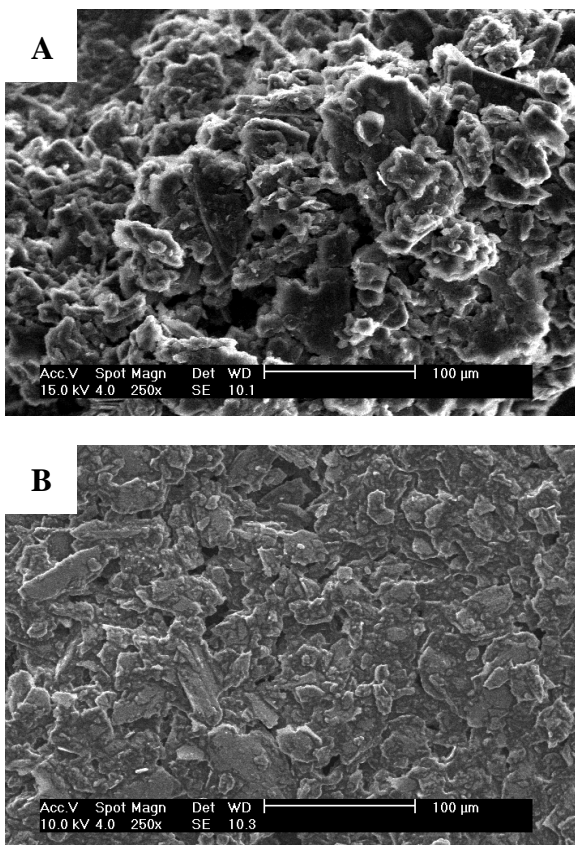


Figura 20. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biossensores contendo (A) Nujol e (B) líquido iônico BMI.PF₆.

4.1.4. Processo enzimático na superfície do eletrodo

Reações catalisadas por enzimas têm sido extensivamente usadas em determinações de diferentes analitos de interesse farmacêutico. A peroxidase catalisa a oxidação de mono-, di-, poli- e aminofenóis, entre outros, para sua quinona correspondente, na presença de peróxido de

hidrogênio. O desenvolvimento de vários biossensores que utilizam peroxidase proveniente de material vegetal (extrato bruto ou tecido) tem sido reportado na literatura (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002; VIEIRA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2006 A, B e C; FELIX *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2007). Estes eletrodos têm apresentado alta estabilidade, elevada atividade enzimática e baixo custo de produção comparado com biossensores que empregam enzimas purificadas.

A Figura 21 mostra um esquema da reação enzimática entre adrenalina e a peroxidase vegetal na superfície do biossensor. Inicialmente, a adrenalina (A) em contato com a peroxidase, na presença de peróxido de hidrogênio, é oxidada à adrenalinaquinona (B). Então, esta *o*-quinona é reduzida eletroquimicamente na superfície do eletrodo a um potencial de $-0,23$ V vs. Ag/AgCl. A corrente de pico resultante obtida é diretamente proporcional à concentração do analito.

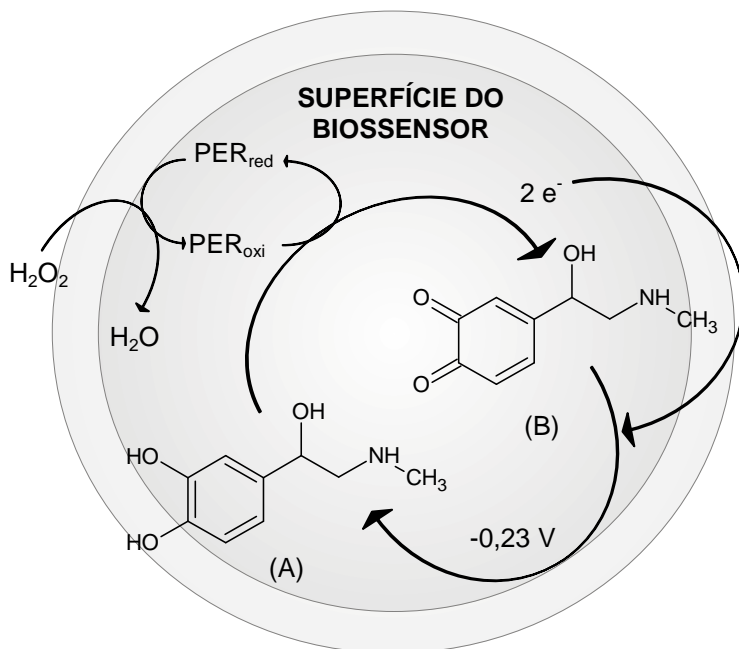


Figura 21. Representação esquemática da oxidação/redução da adrenalina na superfície do biossensor. PER_{red} : peroxidase reduzida; PER_{oxi} : peroxidase oxidada.

4.1.5. Otimização do método

4.1.5.1. Porcentagem de líquido iônico

Uma investigação do efeito da proporção das substâncias empregadas na construção dos biossensores foi realizada. Em estudos prévios feitos pelo nosso grupo (OLIVEIRA *et al.*, 2006 A e B; FERNANDES *et al.*, 2007) a melhor composição da pasta de carbono foi definida pela razão 70:20:10% (m/m) de pó de grafite:aglutinante:enzima-suporte. Então, esta composição foi usada no presente estudo para a construção dos biossensores, avaliando-se a contribuição de diferentes aglutinantes (Nujol e LI) e proporções no desempenho dos eletrodos.

A Figura 22 apresenta os voltamogramas cíclicos (A) e de onda quadrada (B) obtidos com os biossensores contendo LI (BMI.PF₆) e/ou Nujol como aglutinante, em diferentes proporções. As seguintes proporções de Nujol:BMI.PF₆ foram investigadas: (I) 100:0; (II) 50:50 e (III) 0:100 (% , m/m). Neste estudo foram comparadas as respostas analíticas destes biossensores para a determinação de adrenalina. Nos voltamogramas cíclicos (Figura 22-A), as medidas foram executadas em uma faixa de potencial entre +0,2 e -0,5 V *vs.* Ag/AgCl, a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹, em solução tampão fosfato (pH 7,0) contendo 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ de adrenalina e 9,69x10⁻⁵ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio. Conforme pode ser observado, houve um acréscimo na corrente de fundo (corrente capacitiva) com o aumento da porcentagem de LI, devido à capacitância da dupla camada ser maior no eletrodo contendo LI do que no eletrodo construído com Nujol (LIU *et al.*, 2005; MALEKI *et al.*, 2006).

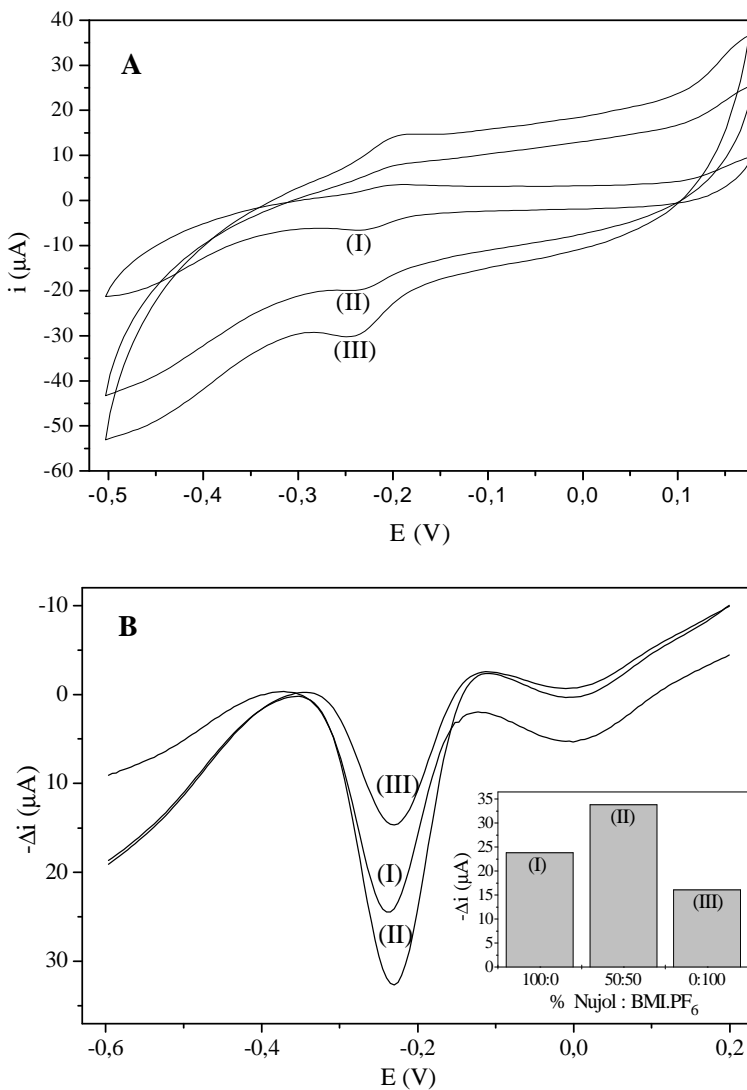


Figura 22. Voltamogramas cíclicos (A) e de onda quadrada (B) obtidos usando biossensores contendo Nujol:BMI.PF₆ nas proporções (I) 100:0 (m/m); (II) 50:50 (m/m) e (III) 0:100% (m/m), em solução tampão fosfato (pH 7,0) contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina e $9,69 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio. (A) velocidade de 100 mV s^{-1} ; (B) frequência de 80 Hz, amplitude de 60 mV, incremento de 5,0 mV. Inserido: valores de corrente referentes a cada composição.

Contudo, como previamente relatado na literatura (MALEKI *et al.*, 2006), a adição de LIs em EPCs modifica a microestrutura da pasta e causa uma diminuição da resistência a transferência de elétrons, levando a um aumento na taxa dessa transferência, devido a elevada condutividade do LI. Nos voltamogramas de onda quadrada mostrados na Figura 22-B, a contribuição da corrente capacitiva é suprimida. Por conseguinte, um aumento na corrente de pico foi observada até uma razão Nujol: BMI.PF₆ de 50:50% (m/m). Entretanto, uma diminuição considerável na corrente de pico foi observada quando usado o biossensor contendo 100% BMI.PF₆ como aglutinante, sendo este resultado atribuído provavelmente à elevada resistência desse eletrodo causadas pela presença de LI em alta proporção. (MUSAMEH e WANG, 2008). O mesmo comportamento foi informado anteriormente para a redução eletroquímica de ácido rosmarínico em EPCs modificados com o mesmo LI (FRANZOI *et al.*, 2009 B).

Portanto, foram selecionados o biossensor I (Nujol, 100%) e biossensor II (Nujol: BMI.PF₆, 50:50%) para realizar os estudos seguintes até a determinação, possibilitando avaliar a contribuição do LI quando usado em proporções adequadas. Para fins representativos, nas figuras contendo os resultados de otimização dos biossensores serão apresentadas as correntes relativas ao biossensor II, sendo que o biossensor I apresentou os mesmos valores ótimos para todos os parâmetros investigados.

4.1.5.2. Concentração de enzima

Para otimização dos biossensores I e II, vários parâmetros experimentais foram investigados através de voltametria de onda quadrada. Inicialmente, o efeito de concentração de enzima de 1,5 a 10,0 unidades mg⁻¹ de pasta de carbono foi estudado em eletrodos com uma composição de 70:20:10% (m/m/m) de grafite em pó: aglutinante: peroxidase imobilizada em quitina modificada. As respostas analíticas dos biossensores imersos em solução contendo 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ de adrenalina e 9,69x10⁻⁵ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio aumentaram até uma composição de peroxidase equivalente a 7,5 unidades mg⁻¹ de pasta de carbono, decrescendo em quantidades maiores de enzima, conforme observado na Figura 23. Portanto, a concentração de peroxidase de 7,5 unidades mg⁻¹ de pasta foi usada na construção dos próximos biossensores.

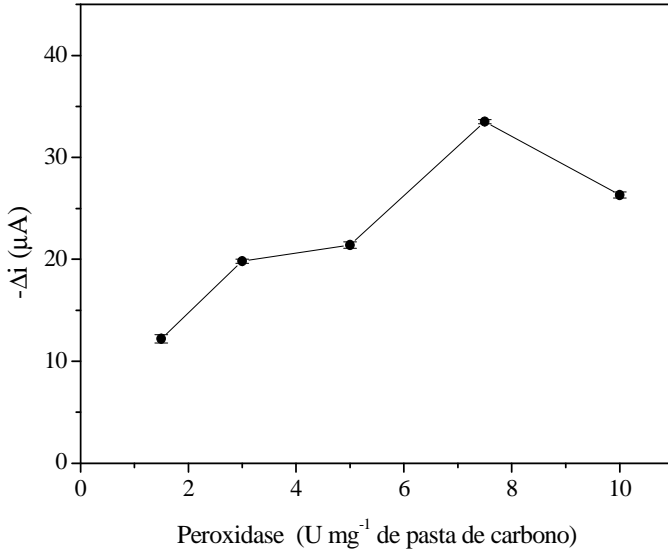


Figura 23. Estudo da concentração de enzima nos biossensores utilizando solução contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina e $9,69 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

4.1.5.3. Efeito do pH e concentração de peróxido de hidrogênio

O efeito do pH foi investigado na faixa entre 6,0 e 8,0, sobre a resposta dos biossensores I e II em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina e $9,69 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio, como mostrado na Figura 24. A maior intensidade da corrente de pico foi obtida em pH 7,0, estando de acordo com os resultados informados em outros estudos com biossensores contendo enzima peroxidase obtida de vegetais (OLIVEIRA *et al.*, 2006 A e B; FERNANDES *et al.*, 2007). Então, solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, em pH 7,0, foi usada como eletrólito suporte nas experiências seguintes.

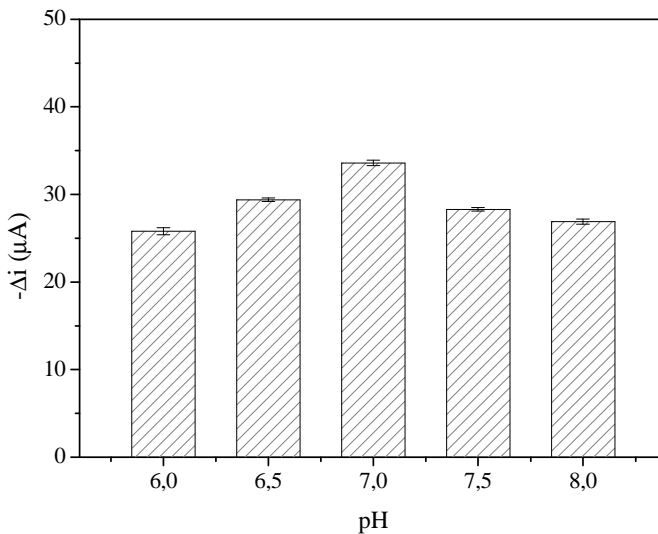


Figura 24. Efeito do pH sobre a resposta dos biossensores utilizando solução contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina e $9,69 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato $0,1$ mol L⁻¹.

Além disso, a influência da concentração de peróxido de hidrogênio na resposta dos biossensores foi investigada na faixa entre $4,87 \times 10^{-5}$ e $2,85 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. De acordo com os resultados apresentados na Figura 25, as correntes de pico tiveram significativa elevação até a concentração de $9,69 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de H₂O₂, em quantidades maiores deste reagente o aumento não foi considerável. Desta forma, a concentração de $9,69 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio foi selecionada para os demais estudos.

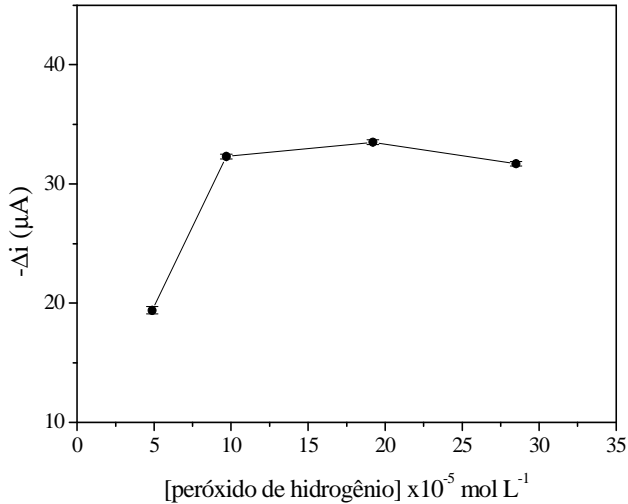


Figura 25. Efeito da concentração do peróxido de hidrogênio sobre a resposta dos biossensores utilizando solução contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

4.1.5.4. Parâmetros de voltametria de onda quadrada

Os parâmetros de voltametria de onda quadrada foram estudados para a obtenção do melhor desempenho dos biossensores I e II nas análises de adrenalina, sob as condições anteriormente selecionadas. A Figura 26 apresenta os resultados destes estudos realizados utilizando soluções contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina e $9,69 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

Para o estudo da frequência foi investigada em uma faixa de 10 a 100 Hz, fixando a amplitude em 100 mV e o incremento em 5,0 mV. O gráfico ilustrado na Figura 26-A mostra que a corrente de resposta para a adrenalina aumentou linearmente até 80 Hz, mantendo-se praticamente constante em maiores frequências; portanto, o valor de 80 Hz foi selecionado para os estudos subsequentes.

A amplitude de pulso foi investigada em intervalo de 10 a 100 mV, fixando a frequência em 80 Hz e o incremento em 5,0 mV. De acordo com os resultados mostrados na Figura 26-B, houve um crescimento linear da intensidade da corrente de pico até 60 mV. Desta forma, a amplitude de 60 mV foi escolhida como ideal para os próximos estudos.

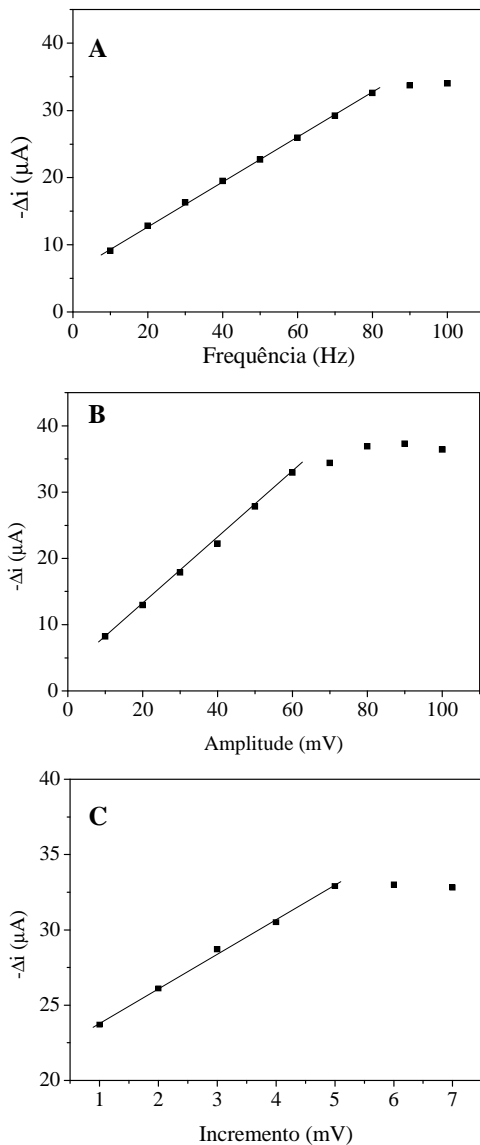


Figura 26. Investigação dos parâmetros de voltametria de onda quadrada sobre a resposta analítica dos biossensores utilizando solução contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina e $9,69 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). (A) Estudo da frequência; (B) Estudo da amplitude; (C) Estudo do incremento.

Uma investigação do incremento também foi realizada em intervalo de 1,0 a 7,0 mV, fixando a frequência em 80 Hz e a amplitude em 60 mV. Conforme informações da Figura 26-C, houve um aumento significativo da resposta analítica até 5,0 mV, com leve decréscimo em valores maiores de incremento. Desta forma, o incremento de 5,0 mV foi selecionado para os estudos posteriores.

A Tabela 2 resume os principais parâmetros analíticos investigados, mostrando as faixas estudadas e os valores selecionados, para a otimização do método usando os biossensores (I e II) propostos.

Tabela 2. Parâmetros de otimização do método proposto

Parâmetro	Faixa investigada	Melhor valor
Nujol : LI (% , m/m)	100:0 – 0:100	50:50
Peroxidase (unidades mg^{-1} pasta de carbono)	1,5 – 10,0	7,5
pH	6,0 – 8,0	7,0
Peróxido de hidrogênio (mol L^{-1})	$4,87 \times 10^{-5}$ – $2,85 \times 10^{-4}$	$9,69 \times 10^{-5}$
Frequência (Hz)	10 – 100	80
Amplitude (mV)	10 – 100	60
Incremento (mV)	1,0 – 7,0	5,0

4.1.6. Curva analítica da adrenalina

A Figura 27 apresenta os voltamogramas de onda quadrada e as curvas analíticas para adrenalina obtidas empregando o biossensor I (A) e o biossensor II (B), respectivamente, sob as condições experimentais previamente otimizadas.

A curva analítica do biossensor I (Figura 27-A) foi linear na faixa entre $1,98 \times 10^{-6}$ e $1,06 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} de adrenalina ($-\Delta i = 0,03 + 2,27 \times 10^5$ [adrenalina]; $r = 0,9996$), onde Δi é a corrente de pico em μA e [adrenalina] é a concentração de adrenalina em mol L^{-1} . O limite de detecção (3 x desvio padrão do intercepto/inclinação) e o limite de quantificação (10 x desvio padrão do intercepto/inclinação) encontrados foram $3,96 \times 10^{-7}$ e $1,32 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} , respectivamente.

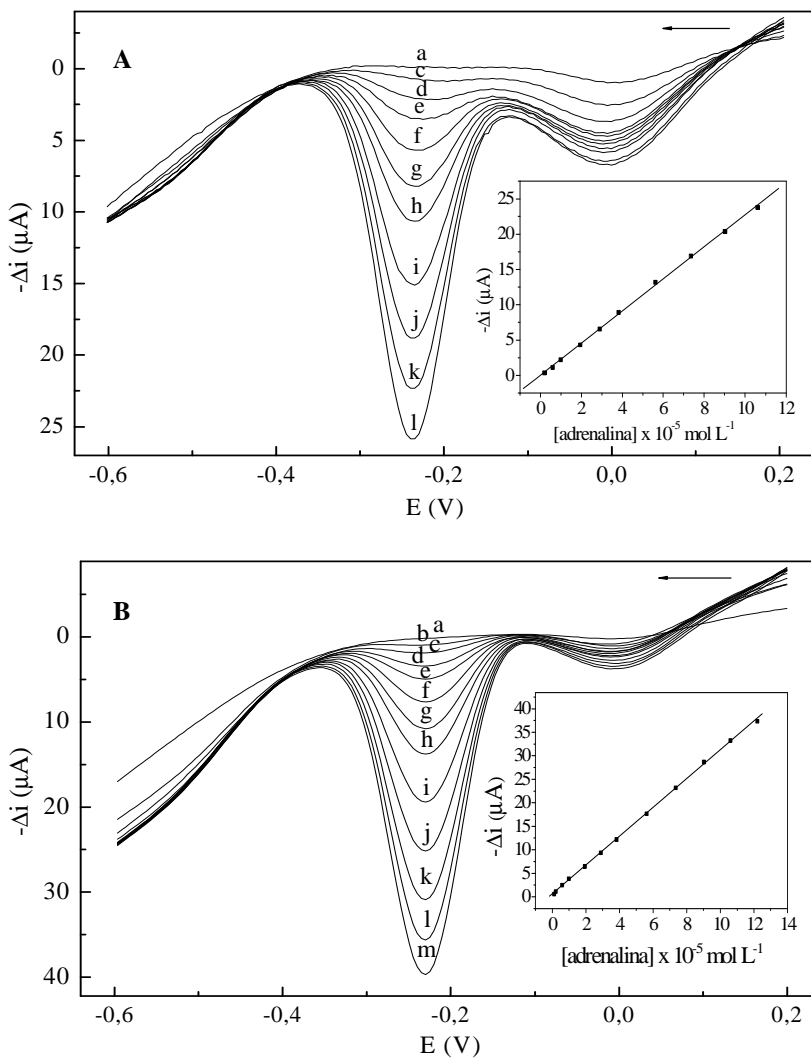


Figura 27. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor I (A) e o biossensor II (B), em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) para (a) $9,69 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio e soluções de adrenalina nas seguintes concentrações: (b) $9,89 \times 10^{-7}$; (c) $1,98 \times 10^{-6}$; (d) $5,91 \times 10^{-6}$; (e) $9,80 \times 10^{-6}$; (f) $1,94 \times 10^{-5}$; (g) $2,89 \times 10^{-5}$; (h) $3,81 \times 10^{-5}$; (i) $5,61 \times 10^{-5}$; (j) $7,34 \times 10^{-5}$; (k) $9,01 \times 10^{-5}$; (l) $1,06 \times 10^{-4}$ e (m) $1,22 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em frequência de 80 Hz, amplitude de 60 mV e incremento de 5,0 mV. Inserido: curvas analíticas correspondentes.

A curva analítica obtida para o biossensor II (Figura 27-B) apresentou linearidade de $9,89 \times 10^{-7}$ até $1,22 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina ($-\Delta i = 0,05 + 3,07 \times 10^5$ [adrenalina]; $r = 0,9998$), com limite de detecção de $2,27 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e limite de quantificação de $7,56 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Pode ser verificado que o biossensor (II) apresentou uma faixa linear mais ampla, menor limite de detecção e maior inclinação da curva analítica (indicando uma maior sensibilidade de calibração), provavelmente, devido à alta condutividade do líquido iônico combinada com a proporção ideal utilizada na construção do biossensor.

4.1.7. Repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade dos biossensores

A repetibilidade das medidas de corrente obtidas usando os biossensores propostos foi estudada em solução tampão fosfato contendo adrenalina $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio $9,69 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. O desvio padrão relativo das correntes obtidas para a adrenalina foi de 1,8% para o biossensor I e de 2,0% para o biossensor II, com base em oito medidas sucessivas realizadas usando cada eletrodo.

A reprodutibilidade também foi investigada utilizando quatro biossensores (de cada tipo), preparados independentemente e de igual modo. Uma reprodutibilidade aceitável foi obtida, com desvio padrão relativo de 6,6 e 5,1% para biossensores I e II, respectivamente.

A estabilidade dos biossensores foi investigada por um período de 120 dias, com medidas realizadas em solução tampão fosfato contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina e $9,69 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio. Os biossensores foram estocados à temperatura ambiente, quando fora de uso. As medidas foram realizadas entre 1-5 dias e nenhuma mudança significativa foi observada durante este período, o que pode se atribuir a eficiente imobilização da enzima no suporte de quitina quimicamente modificada.

4.1.8. Interferentes

Experiências preliminares realizadas por Felix *et al.* (2006) mostraram uma interferência significativa do ânion bissulfito nas medidas de determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas empregando biossensores, sendo também observado este fato no presente trabalho. De acordo com o procedimento previamente informado na literatura (FELIX *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2007),

procedeu-se a eliminação do interferente bissulfito através da adição de nitrogênio durante 5 min nas amostras em meio ácido (solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,0). Este procedimento mostrou-se eficaz na remoção do interferente na forma de SO₂, e, por isso, todas as amostras passaram por este rápido tratamento antes das análises.

4.1.9. Estudo de recuperação

Um estudo de recuperação de adrenalina em duas amostras comerciais foi executado, com adição de três alíquotas de soluções padrão dessa catecolamina em diferentes concentrações (3,26; 6,49 e 9,64 mg L⁻¹). Os resultados encontrados foram comparados com as concentrações adicionadas e apresentados de modo resumido na Tabela 3. A recuperação variou de 96,0 a 102,6% para o biossensor I e 97,9 a 100,8% para o biossensor II. Estes resultados demonstram uma exatidão satisfatória dos biossensores desenvolvidos e indicam a ausência de efeitos de matriz nestas determinações.

Tabela 3. Recuperação de adrenalina em formulações farmacêuticas usando os biossensores propostos

Amostra	Adrenalina (mg L ⁻¹)				Recuperação (%)	
	Adicionado	Encontrado		Biossensor (I)	Biossensor (II)	
		Biossensor (I)*	Biossensor (II)*			
A	3,26	3,13±0,07	3,19±0,03	96,0	97,9	
	6,49	6,36±0,06	6,49±0,05	98,0	100,0	
	9,64	9,77±0,04	9,66±0,04	101,3	100,2	
B	3,26	3,15±0,05	3,22±0,04	96,6	98,8	
	6,49	6,49±0,05	6,54±0,05	100,0	100,8	
	9,64	9,89±0,07	9,60±0,06	102,6	99,6	

*n=3; A e B = adrenalina injetável.

4.1.10. Determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas

As concentrações de adrenalina em duas amostras de formulações farmacêuticas foram determinadas usando os biossensores propostos. As amostras foram previamente preparadas como descrito anteriormente e quantificados pelo método da adição de padrão. Os resultados das análises realizadas usando os biossensores I e II foram comparados com o método padrão (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007) e o valor rotulado (Tabela 4). Aplicando o teste *t* para os resultados obtidos

usando os biossensores I e II, o valor de t calculado (t_C) foi menor que o valor teórico (t_T) (2,78) para uma média de cinco medidas a 95% de nível de confiança, indicando que não há diferença significativa entre os resultados obtidos. Também, o valor de F calculado (F_C) foi menor que o valor de F teórico (F_T) (6,39). Os erros relativos encontrados entre biossensor e método padrão foram muito pequenos, na faixa de -1 e $+1\%$. Portanto, estas análises estatísticas demonstram boa exatidão dos resultados obtidos com os biossensores propostos quando comparados ao método padrão.

Tabela 4. Determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas usando método padrão e os biossensores propostos

Amostra	Valor rotulado	Método padrão*	Adrenalina (mg mL ⁻¹)		Erro relativo (Er) (%)	
			Biossensor (I)*	Biossensor (II)*	Er ₁	Er ₂
			A	1,00	1,02±0,08	X = 1,01±0,05 $t_C = 0,45$ $F_C = 2,6$
B	1,00	0,97±0,07	X = 0,96±0,03 $t_C = 0,75$ $F_C = 5,4$	X = 0,98±0,03 $t_C = 0,75$ $F_C = 5,4$	-1,0	+1,0

*n = 5; A e B = adrenalina injetável; X = média ± desvio padrão; t_C = valor de t calculado e t_T = valor teórico (2,78), nível de confiança de 95%; F_C = valor de F calculado e F_T = valor teórico (6,39), nível de confiança de 95%; Er₁ = biossensor I vs. método padrão; Er₂ = biossensor II vs. método padrão.

4.2. BIOSSENSOR CONTENDO LACASE E NANOPARTÍCULAS DE PLATINA EM LÍQUIDO IÔNICO

4.2.1. Contribuição das nanopartículas em líquido iônico

O comportamento eletroquímico da adrenalina usando o biossensor contendo lacase e nanopartículas de platina dispersas em LI (biossensor-Pt-BMI.PF₆), o biossensor sem nanopartículas de platina (biossensor-BMI.PF₆) e o eletrodo de pasta de carbono sem modificação (EPC) foram investigados através de voltametria de onda quadrada em uma faixa de potencial entre $-0,5$ e $0,0$ V vs. Ag/AgCl. A Figura 28 mostra os voltamogramas obtidos usando o EPC (a), biossensor-BMI.PF₆ (b) e biossensor-Pt-BMI.PF₆ (c) em $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina em solução tampão fosfato ($0,1$ mol L⁻¹; pH 6,5); amplitude

de pulso de 80 mV, frequência de 20 Hz e incremento de 5,0 mV. Como pode ser observado, o biossensor-Pt-BMI.PF₆ apresentou uma resposta maior de corrente de redução da *o*-quinona para adrenalina a um potencial de -0,21 V em comparação com o biossensor sem nanopartículas de platina e o EPC. A corrente de pico para adrenalina usando o biossensor-BMI.PF₆ correspondeu a 64,2% da resposta do biossensor contendo nanopartículas de platina em LI, enquanto que o EPC obteve uma resposta correspondendo a apenas 13,8% da resposta do eletrodo selecionado (biossensor-Pt-BMI.PF₆).

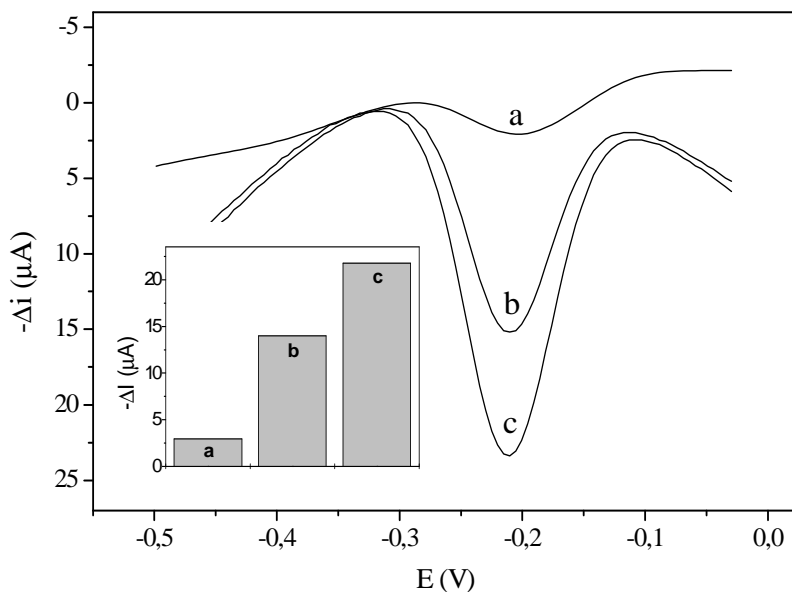


Figura 28. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando (a) EPC; (b) biossensor-BMI.PF₆; (c) biossensor-Pt-BMI.PF₆ em solução contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 6,5); frequência de 20 Hz; amplitude de 80 mV, incremento de 5,0 mV.

4.2.2. Reação enzimática na superfície do eletrodo

Extensivos esforços em pesquisa foram dedicados a avaliar as possibilidades oferecidas pelas enzimas dentro das aplicações biotecnológicas e ambientais (DURÁN *et al.*, 2002). Comercialmente, a lacase tem sido usada principalmente para deslignificação de tecidos lenhosos, produção de etanol e biorremediação. A realização de intensas pesquisas com lacase nos recentes anos pode ser atribuída à grande

diversidade destas enzimas, além do seu vasto campo de aplicação e enzimologia muito interessante (MAYER e STAPLES, 2002; DURÁN *et al.*, 2002). Reações catalisadas por estas enzimas foram amplamente usadas na determinação de diferentes analitos, particularmente de interesse farmacêutico.

Vários biossensores contendo lacase foram descritos na literatura (GOMES *et al.*, 2004; SANTHIAGO e VIEIRA, 2007; PUMERA *et al.*, 2007; FRANZOI *et al.*, 2009 B), como previamente discutido. A Figura 29 apresenta uma representação esquemática da reação enzimática envolvendo a adrenalina e a lacase na superfície do biossensor-Pt-BMLPF₆. Semelhante ao que ocorre com a enzima peroxidase, anteriormente descrito, a (A) adrenalina é oxidada através da lacase em presença de oxigênio molecular para (B) adrenalinaquinona (FELIX *et al.*, 2006). Então, esta *o*-quinona é reduzida eletroquimicamente na superfície do eletrodo em um potencial de $-0,21\text{ V vs. Ag/AgCl}$. A corrente de pico resultante é usada como resposta analítica para a determinação e quantificação de adrenalina.

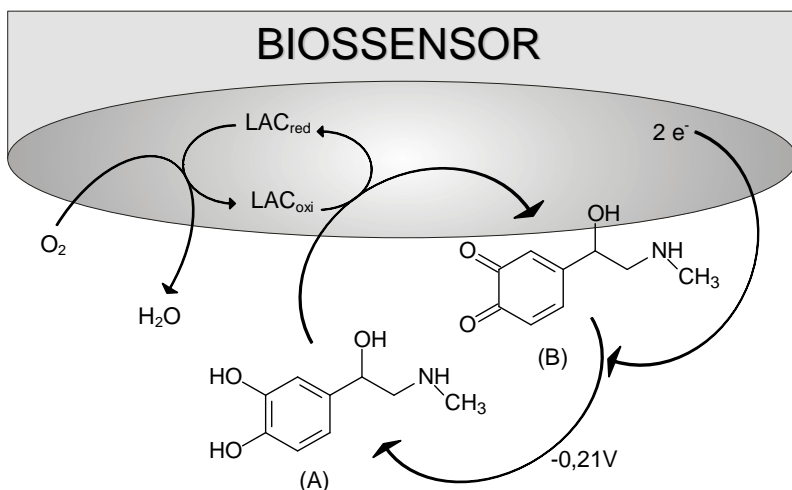


Figura 29. Representação esquemática do processo enzimático entre a adrenalina (A), oxigênio e lacase, e a redução eletroquímica da adrenalinaquinona (B) na superfície do biossensor. LAC_{red} : lacase na forma reduzida e LAC_{oxi} : lacase na forma oxidada.

4.2.3. Otimização do método

4.2.3.1. Porcentagem de líquido iônico contendo nanopartículas

O efeito das razões de Nujol:Pt-BMI.PF₆ (a) 100:0, (b) 75:25, (c) 50:50, (d) 25:75 e (e) 0:100% (m/m) foi investigado, e as respostas do biossensor na determinação de adrenalina por voltametria cíclica (A) e voltametria de onda quadrada (B) são comparadas na Figura 30. Como pode ser visto nos voltamogramas cíclicos (Figura 30-A), a corrente de fundo aumentou com um aumento no conteúdo de LI. Conforme relatado por MALEKI *et al.* (2006), a adição de LIs em um EPC modifica a estrutura da pasta, causando um aumento na taxa de transferência de elétrons. Este fato se deve à alta condutividade do eletrodo contendo LI em comparação com o uso de outros aglutinantes. Contudo, quando a contribuição da corrente capacitiva foi suprimida (voltamogramas de onda quadrada – Figura 30-B), um aumento na corrente de pico catódica foi observado até uma relação de Nujol:Pt-BMI.PF₆ de 50:50%; depois disso a resposta decresceu consideravelmente. Este mesmo comportamento foi observado no trabalho descrito anteriormente e também descrito para outros biossensores que contêm LIs em estudos reportados na literatura (FRANZOI *et al.*, 2009 A e B). Conseqüentemente, a razão 50:50% (m/m) de Nujol:Pt-BMI.PF₆ foi usada para subseqüentes construções de biossensores, sendo as análises para determinação de adrenalina em amostras farmacêuticas realizadas através de voltametria de onda quadrada.

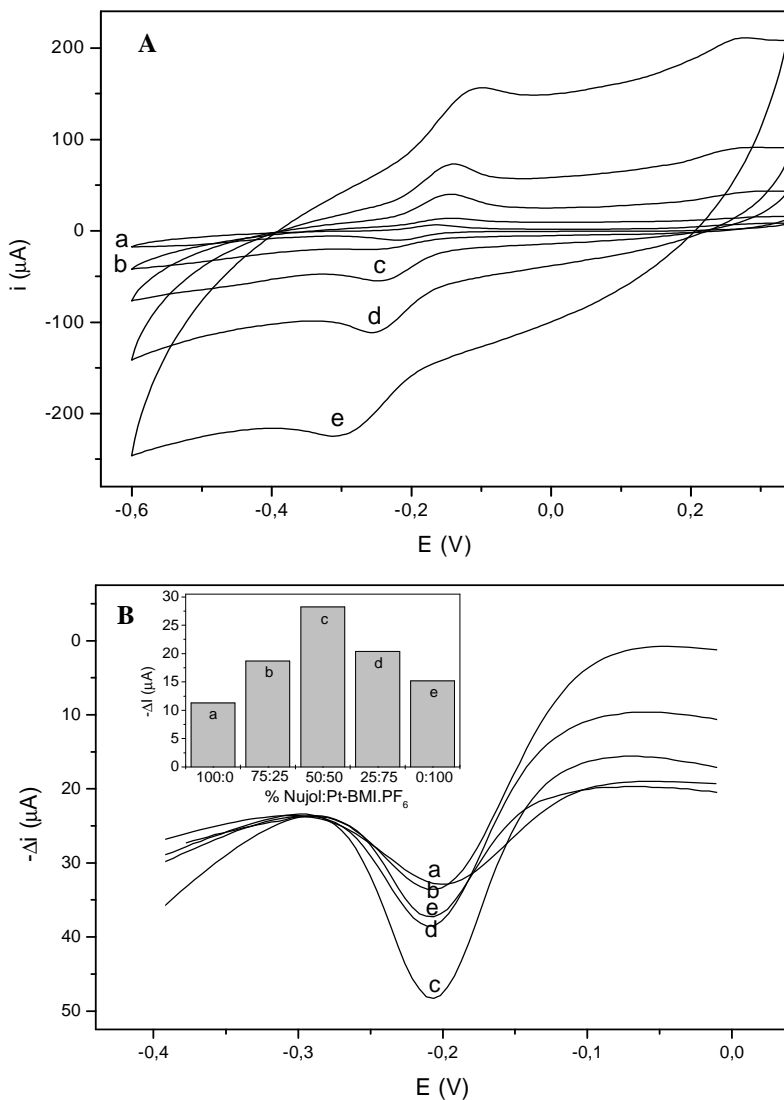


Figura 30. Voltamogramas cíclicos (A) e de onda quadrada (B) usando Nujol:Pt-BMI.PF₆ nas razões (a) 100:0, (b) 75:25, (c) 50:50, (d) 25:75 e (e) 0:100% (m/m) no biossensor de lacase imerso em solução tampão fosfato pH 6,5 contendo (A) $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina a 100 mV s^{-1} e (B) $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina em frequência de 20 Hz, amplitude de 80 mV e incremento de 5,0 mV. Inserido: valores de corrente para cada composição do biossensor.

4.2.3.2. Porcentagem de enzima

A influência da porcentagem de lacase em microcápsulas adicionada no EPC modificado com nanopartículas de platina em LI foi investigada na faixa entre 5 e 40% (m/m). Conforme mostrado na Figura 31, a corrente de pico da adrenalina aumentou com o aumento da quantidade de enzima até 20,0% (m/m). Então, esta porcentagem de lacase foi selecionada para estudos adicionais; e uma composição 50:20:15:15% (m/m/m/m) de pó de grafite:lacase:Nujol:Pt-BMI.PF₆, respectivamente, foi usada na construção do biossensor-Pt-BMI.PF₆. Recentemente, Franzoi *et al.* (2009 B) realizaram a investigação de parâmetros similares para construção de um biossensor de lacase para determinação de ácido rosmarínico, obtendo resultados semelhantes.

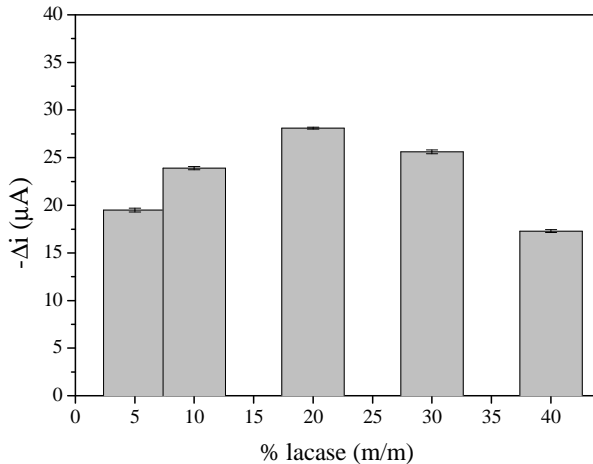


Figura 31. Estudo da porcentagem de enzima no biossensor utilizando solução contendo $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5).

4.2.3.3. Eletrólito suporte e pH

Após a otimização da composição do biossensor, o efeito do eletrólito suporte/pH foi investigado, em triplicata, na faixa entre 4,0 e 7,5 sobre a resposta do biossensor proposto utilizando solução contendo $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina em tampão acetato (pH 4,0–5,0) ou fosfato (pH 6,0–7,5) 0,1 mol L⁻¹, como mostrado na Figura 32. A maior resposta para o analito foi obtida em pH 6,5, mostrando similaridade

com resultados informados em outros estudos com biossensores contendo a enzima lacase de *Aspergillus oryzae* (SANTHIAGO e VIEIRA, 2007; FRANZOI *et al.*, 2009 A e B). Então, a solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, em pH 6,5, foi usada como eletrólito suporte nas experiências subsequentes.

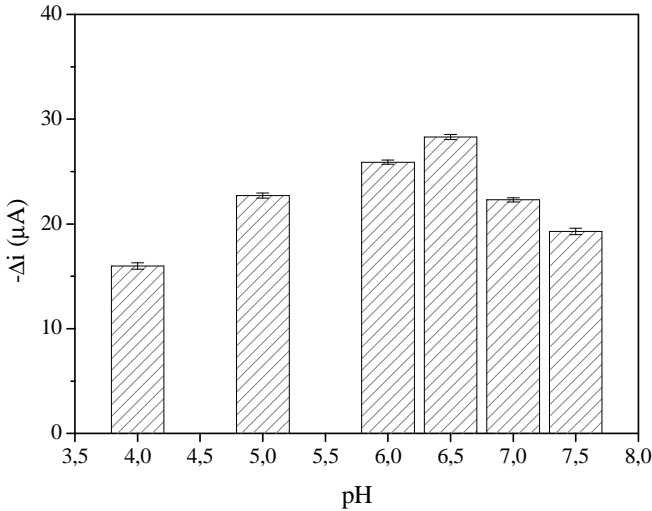


Figura 32. Efeito do eletrólito suporte/pH sobre a resposta do biossensor utilizando solução contendo $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina em tampão acetato (pH 4,0–5,0) ou fosfato (pH 6,0–7,5) 0,1 mol L⁻¹.

4.2.3.4. Parâmetros de voltametria de onda quadrada

A avaliação dos parâmetros da voltametria de onda quadrada, tais como; frequência, amplitude de pulso e incremento são extremamente importantes, pois a partir da otimização dos mesmos é possível obter um biossensor com maior sensibilidade. Por esta razão, estes parâmetros foram investigados utilizando soluções contendo $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5) e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 33.

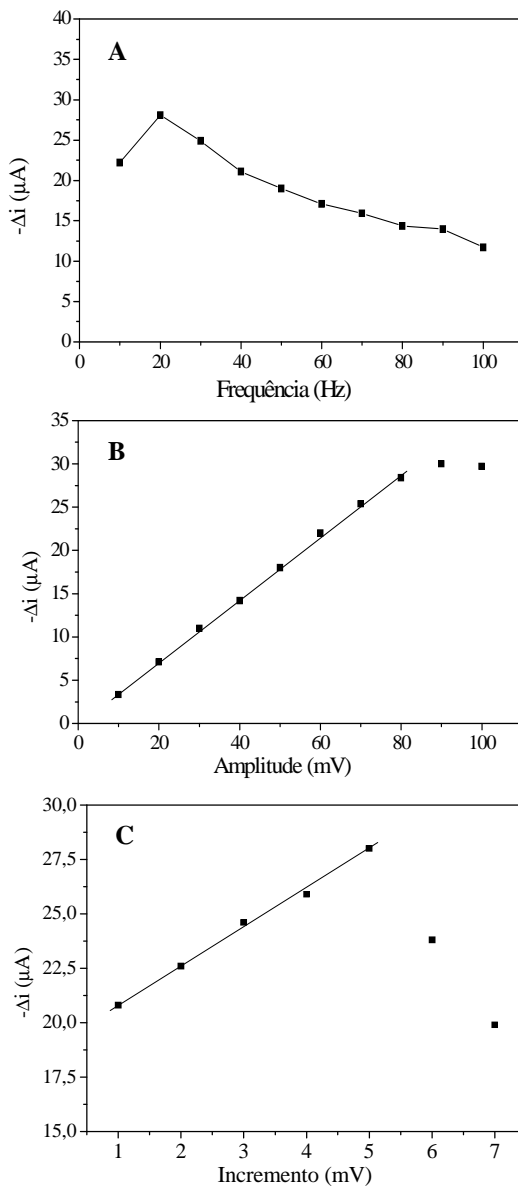


Figura 33. Investigação dos parâmetros de voltametria de onda quadrada sobre a resposta analítica do biossensor utilizando solução contendo $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de adrenalina em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5). (A) Estudo da frequência; (B) Estudo da amplitude; (C) Estudo do incremento.

No estudo da frequência foi investigado um intervalo de 10 a 100 Hz, fixando a amplitude em 80 mV e o incremento em 5,0 mV. A frequência de 20 Hz foi selecionada, pois a maior corrente de resposta para a adrenalina foi neste valor, sendo significativamente menor nas demais frequências testadas (Figura 33-A).

A amplitude de pulso foi investigada em uma faixa de 10 a 100 mV, fixando a frequência em 20 Hz e o incremento em 5,0 mV. De acordo com os resultados mostrados na Figura 33-B, a amplitude escolhida foi 80 mV, pois houve um crescimento linear da intensidade da corrente de pico até este ponto, mantendo-se constante em valores maiores.

Um estudo do incremento também foi realizado em intervalo de 1,0 a 7,0 mV, fixando a frequência em 20 Hz e a amplitude em 80 mV. Conforme mostrado pela Figura 33-C, houve um aumento significativo da resposta analítica até 5,0 mV, com decréscimo da corrente em valores maiores de incremento. Desta forma, o incremento de 5,0 mV foi selecionado para os estudos posteriores.

A Tabela 5 reúne os principais parâmetros analíticos investigados, mostrando as faixas estudadas e os valores selecionados, para a otimização do método usando o biossensor proposto.

Tabela 5. Parâmetros de otimização do método proposto

Parâmetro	Faixa investigada	Valor ótimo
Nujol:Pt-BMI.PF ₆ (% , m/m)	100:0 – 0:100	50:50
Lacase (% , m/m)	5 – 40	20
pH	4,0 – 7,5	6,5
Frequência (Hz)	10 – 100	20
Amplitude (mV)	10 – 100	80
Incremento (mV)	1,0 – 7,0	5,0

4.2.4. Curva analítica da adrenalina

Sob as condições experimentais otimizadas, os voltamogramas de onda quadrada e a curva analítica para a adrenalina foram obtidos empregando o biossensor proposto, conforme mostrado na Figura 34. A curva analítica obtida com este biossensor apresentou faixa linear de $9,99 \times 10^{-7}$ a $2,13 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina ($-\Delta i = 0,21 + 2,10 \times 10^5$ [adrenalina]; $r = 0,9998$), onde Δi é a corrente de pico resultante em μA e [adrenalina] é a concentração de adrenalina em mol L⁻¹. O limite de

deteção (3 x desvio padrão do intercepto/inclinação) e o limite de quantificação (10 x desvio padrão do intercepto/inclinação) encontrados foram $2,93 \times 10^{-7}$ e $9,76 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente.

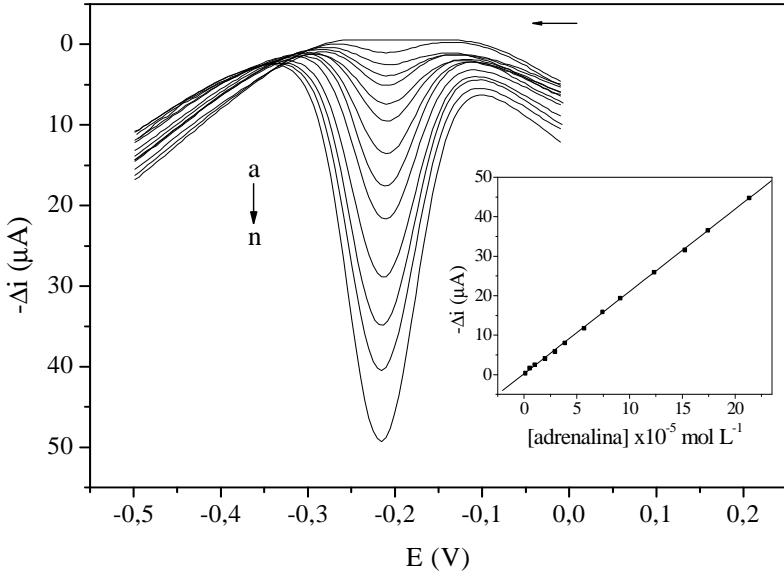


Figura 34. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto em (a) solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 6,5) e soluções de adrenalina nas seguintes concentrações: (b) $9,99 \times 10^{-7}$; (c) $4,97 \times 10^{-6}$; (d) $9,90 \times 10^{-6}$; (e) $1,96 \times 10^{-5}$; (f) $2,91 \times 10^{-5}$; (g) $3,85 \times 10^{-5}$; (h) $5,66 \times 10^{-5}$; (i) $7,41 \times 10^{-5}$; (j) $9,09 \times 10^{-5}$; (k) $1,23 \times 10^{-4}$; (l) $1,52 \times 10^{-4}$; (m) $1,74 \times 10^{-4}$ e (n) $2,13 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em frequência de 20 Hz, amplitude de 80 mV e incremento de 5,0 mV. Inseto: curva analítica da adrenalina.

4.2.5. Repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade do biossensor

A repetibilidade da corrente de pico resultante (resposta analítica) obtida usando o mesmo biossensor foi investigada em soluções de tampão fosfato (pH 6,5) contendo $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina. O desvio padrão relativo foi de 3,4% para oito medidas sucessivas. A reprodutibilidade foi investigada considerando quatro biossensores preparados independentemente. Uma boa reprodutibilidade foi obtida, com desvio padrão relativo de aproximadamente 4,8% para o biossensor proposto.

Outros parâmetros importantes nas determinações analíticas são a estabilidade e o tempo de vida útil do biossensor. Assim, estes parâmetros foram investigados para o biossensor proposto com medidas realizadas a cada 1–10 dias, durante um período de 90 dias (mais de 300 determinações para cada quantidade de pasta de carbono usada na seringa); sendo armazenado à temperatura ambiente quando não utilizado. Como pode ser observado na Figura 35, o biossensor mostrou uma estabilidade operacional excelente, mantendo uma resposta correspondente a mais de 80% (em relação à resposta inicial), durante 90 dias.

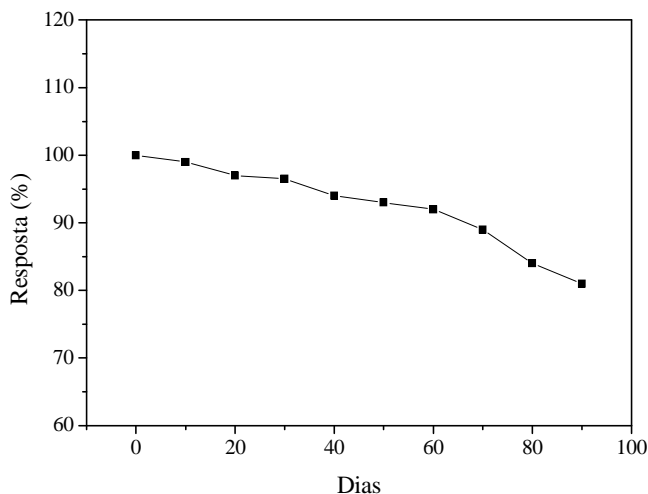


Figura 35. Estudo da estabilidade e tempo de vida útil do biossensor proposto usando $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de adrenalina em solução tampão fosfato (pH 6,5).

4.2.6. Interferentes e estudo de recuperação

Conforme relatado anteriormente (item 4.1.8), a interferência do bissulfito de sódio nas medidas de quantificação da adrenalina em amostras farmacêuticas empregando biossensores foi eliminada através da borbulhação de nitrogênio nas amostras dissolvidas em meio ácido.

Um estudo de recuperação foi executado, em triplicata, usando três amostras de formulações farmacêuticas (A, B e C: injeção de adrenalina) com três diferentes concentrações de padrão de adrenalina (3,30; 6,54 e 9,73 mg L⁻¹) e as concentrações encontradas foram

comparadas com as concentrações adicionadas. Os resultados foram reunidos na Tabela 6, e mostram que recuperações médias variaram de 95,5% até 104,2%, demonstrando uma precisão satisfatória do biossensor desenvolvido, e indicando a ausência de efeitos de matriz nestas determinações.

Tabela 6. Recuperação de adrenalina em formulações farmacêuticas usando o biossensor proposto

Amostra	Adrenalina (mg L ⁻¹)		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado*	
A	3,30	3,24±0,06	98,2
	6,54	6,74±0,07	103,1
	9,73	9,62±0,04	98,9
B	3,30	3,44±0,07	104,2
	6,54	6,63±0,05	101,4
	9,73	9,66±0,06	99,3
C	3,30	3,15±0,04	95,5
	6,54	6,43±0,06	98,3
	9,73	9,88±0,05	101,5

A, B e C = adrenalina injetável; *n = 3

4.2.7. Determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas

O método proposto foi avaliado aplicando-o para a determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas. As concentrações de adrenalina em três amostras de formulações injetáveis foram determinadas, em triplicata, usando o biossensor proposto e um método espectrofotométrico padrão (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007). Os resultados das quantificações usando o biossensor, o método de referência e o valor do rótulo foram comparados, conforme apresentado na Tabela 7. De acordo com o teste-*t*, em nível de 95% de confiança, não há diferença significativa entre o método padrão, os resultados obtidos com o biossensor e o valor rotulado. Portanto, pode ser concluído que o método é satisfatório para a determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas.

Tabela 7. Determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas usando método padrão e o biossensor proposto

Amostra	Adrenalina (mg mL ⁻¹)			Erro relativo (%)		
	Rótulo	Método padrão*	Biossensor*	Er ₁	Er ₂	Er ₃
A	1,00	1,02±0,08	1,04±0,03	+2,0	+2,0	+4,0
B	1,00	0,97±0,07	0,96±0,04	-3,0	-1,0	-4,0
C	1,00	0,98±0,05	0,95±0,04	-2,0	-3,0	-5,0

*n = 3; nível de confiança de 95%; A, B e C = adrenalina injetável; Er₁: método padrão vs. valor rotulado; Er₂: biossensor vs. método padrão; Er₃: biossensor vs. valor rotulado.

4.3. COMPARAÇÃO DOS SENSORES DESENVOLVIDOS PARA DETERMINAÇÃO DE ADRENALINA COM OS REPORTADOS NA LITERATURA

São vários os trabalhos eletroanalíticos reportados na literatura para determinação de adrenalina. A Tabela 8 apresenta um resumo das características analíticas e composições de alguns biossensores e eletrodos modificados descritos na literatura, juntamente com os desenvolvidos no presente trabalho.

De acordo com as informações apresentadas na Tabela 8, pode-se observar que os pesquisadores utilizaram os eletrodos de pasta de carbono (EPCs) e os eletrodos de ouro como base para a construção de eletrodos modificados para determinação de adrenalina, sendo estes tipos de eletrodos largamente empregados em trabalhos de desenvolvimento de sensores/biossensores. Além disso, diferentes materiais foram utilizados na construção e/ou modificação destes eletrodos, tais como: enzimas – lacase e peroxidase (LEITE *et al.*, 2003), polifenol oxidase (FELIX *et al.*, 2006); filmes eletropolimerizados (ZHOU *et al.*, 2009); nanotubos de carbono e complexos (BEITOLLAHI *et al.*, 2008). Nos trabalhos com eletrodo de ouro, os reagentes *L*-cisteína e 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol foram usados para a montagem das monocamadas auto-organizadas (SAMs) sobre a superfície do eletrodo (WANG *et al.*, 2002; SUN *et al.*, 2006). No presente trabalho, foram utilizadas as enzimas peroxidase e lacase como material biorreceptor dos biossensores desenvolvidos; além disso, foi realizada a incorporação de líquido iônico (BMI.PF₆) ou nanopartículas de platina dispersas em líquido iônico (Pt-BMI.PF₆) na construção dos eletrodos, com a finalidade de aumentar a detectabilidade e sensibilidade dos mesmos.

Em relação às características analíticas, o limite de detecção dos biossensores desenvolvidos no presente trabalho são comparáveis ou melhores que os relacionados na Tabela 8, ficando atrás apenas dos eletrodos de ouro modificados com SAMs (WANG *et al.*, 2002; SUN *et al.*, 2006) e do biossensor bi-enzimático (LEITE *et al.*, 2003), contudo supera estes últimos em comparação à faixa linear. O bom desempenho analítico dos biossensores propostos pode ser atribuído à eficiência catalítica das enzimas empregadas na construção destes eletrodos, bem como à alta condutividade do LI e o fato das nanopartículas metálicas facilitarem a transferência de elétrons, melhorando significativamente a detectabilidade do método.

Tabela 8. Biossensores e eletrodos modificados para determinação de adrenalina

Composição do biossensor / eletrodo modificado	Faixa linear (mol L ⁻¹)	Limite de detecção (mol L ⁻¹)	Referência
Eletrodo de ouro–cisteína–monocamadas auto-organizadas	$1,0 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-8}$	Wang <i>et al.</i> , 2002
Grafite em pó–Nujol–lacase–peroxidase	$6,1 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-8}$	Leite <i>et al.</i> , 2003
Grafite em pó–óleo mineral–polifenol oxidase	$5,0 \times 10^{-5} - 3,5 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-5}$	Felix <i>et al.</i> , 2006
Eletrodo de ouro–triazol–monocamadas auto-organizadas	$1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$ $1,0 \times 10^{-5} - 6,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-8}$	Sun <i>et al.</i> , 2006
Grafite em pó–parafina–nanotubos de carbono–complexo EBNBH	$7,0 \times 10^{-7} - 1,2 \times 10^{-3}$	$2,16 \times 10^{-7}$	Beitollahi <i>et al.</i> , 2008
Grafite em pó–óleo mineral–ácido poliisonicotínico	$5,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-6}$	Zhou <i>et al.</i> , 2009
Grafite em pó–Nujol–BMI.PF ₆ –peroxidase imobilizada em quitina	$9,89 \times 10^{-7} - 1,22 \times 10^{-4}$	$2,27 \times 10^{-7}$	Este trabalho (1ª parte)
Grafite em pó–Nujol–Pt–BMI.PF ₆ –lacase	$9,99 \times 10^{-7} - 2,13 \times 10^{-4}$	$2,93 \times 10^{-7}$	Este trabalho (2ª parte)

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram desenvolvidos e aplicados com sucesso novos biossensores para a determinação de adrenalina através da voltametria de onda quadrada. Foram construídos dois biossensores diferentes, sendo o primeiro, um biossensor de pasta de carbono contendo LI hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMI.PF₆) e peroxidase de milho (*Zea mays* L.) imobilizada em quitina quimicamente modificada com glioxal e carbodiimida, e o segundo, um biossensor contendo microcápsulas de lacase e nanopartículas de platina dispersas em LI (Pt-BMI.PF₆).

Em relação ao primeiro biossensor, pode-se concluir que a quitina quimicamente modificada demonstrou ser um suporte adequado para imobilização da peroxidase obtida de extrato bruto de milho, garantindo maior estabilidade e tempo de vida útil para este eletrodo. A adição de LI em proporção adequada melhorou a sensibilidade do método, em razão deste sal fundido apresentar alta condutividade e proporcionar um aumento na taxa de transferência de elétrons.

Na sequência deste trabalho, o segundo biossensor desenvolvido com a enzima lacase em microcápsulas também apresentou estabilidade e tempo de vida útil apropriados. A adição de LI contendo nanopartículas de platina dispersas garantiu para esse biossensor uma maior sensibilidade, pelos motivos anteriormente mencionados referentes ao LI e também devido à contribuição das nanopartículas metálicas, as quais participam na facilitação da transferência de elétrons.

Sob condições experimentais previamente otimizadas para cada um dos biossensores, foram construídas as curvas analíticas a partir da corrente resultante *vs.* concentração de adrenalina, apresentando linearidade em um intervalo de $9,89 \times 10^{-7}$ até $1,22 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e $9,99 \times 10^{-7}$ até $2,13 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $2,27 \times 10^{-7}$ e $2,93 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente. A recuperação da adrenalina nas amostras de formulações injetáveis variou de 97,9 até 100,8% e 95,5% até 104,2%, respectivamente para os eletrodos desenvolvidos. Por fim, a quantificação da adrenalina em formulações farmacêuticas usando esses biossensores apresentou concordância com o método oficial, confirmando que os métodos propostos são adequados para esta finalidade.

Portanto, pode-se destacar que os biossensores propostos exibiram alta sensibilidade, seletividade satisfatória, boa repetibilidade e reprodutibilidade e estabilidade adequada. Além disso, o baixo custo, simplicidade e rapidez para a construção e aplicação dos biossensores,

tornam esses métodos vantajosos em relação a outras técnicas usadas para determinação de catecolaminas. Estas características fazem destes biossensores alternativas atraentes para aplicação na análise e controle de qualidade de formulações farmacêuticas.

6. REFERÊNCIAS

AMORIM, C. G.; ARAUJO, A. N.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Exploiting sequential injection analysis with lab-on-valve and miniaturized potentiometric detection. Epinephrine determination in pharmaceutical products. **Talanta**, 72, 1255–1260, 2007.

BEITOLLAHI, H.; ARDAKANI, M. M.; GANJIPOUR, B.; NAEIMI, B.; NOVEL, H. 2,2'-[1,2-ethanediylbis(nitriloethylidyne)]-bis-hydroquinone double-wall carbon nanotube paste electrode for simultaneous determination of epinephrine, uric acid and folic acid. **Biosens. Bioelectron.**, 24, 362–368, 2008.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α -e β -quitina. **Quim. Nova**, 30, 644–650, 2007.

CAMPÀS M.; CARPENTIER, R.; ROUILLON, R. Plant tissue-and photosynthesis-based biosensors. **Biotechnol. Adv.**, 26, 370–378, 2008.

CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. **Anal. Bioanal. Chem.**, 2009, DOI 10.1007/s00216-009-3063-7.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996, 446p.

CHERNYSHOV, D. V.; SHVEDENE, N. V.; ANTIPOVA, E. R.; PLETNEV, I. V. Ionic liquid-based miniature electrochemical sensors for the voltammetric determination of catecholamines. **Anal. Chim. Acta**, 621, 178–184, 2008.

CHIOU, S.-H.; WU, W.-T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, 25, 197–204, 2004.

CONSORTI, C. S.; SOUZA, R. F.; DUPONT, J.; SUAREZ, P. A. Z. Líquidos iônicos contendo o cátion dialquilimidazólio: estrutura, propriedades físico-químicas e comportamento em solução. **Quim. Nova**, 24, 830–837, 2001.

COUTO, S.R.; HERRERA, J.L.T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnol. Adv.**, 24, 500–513, 2006.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas. **Quim. Nova**, 27, 623–630, 2004.

DEFTEREOS, T. N.; CALOKERINOS, A. C.; EFSTATHION, C. E. Flow injection chemiluminometric determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and L-dopa. **Analyst**, 118, 627–632, 1993.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo (SP): Edgard Blucher, 2007. 1186p.

DHAWAN, G.; SUMANA, G.; MALHOTRA, B. D. Recent developments in urea biosensors. **Biochem. Eng. J.**, 44, 42–52, 2009.

DING, C.; ZHANG, M.; ZHAO, F.; ZHANG, S. Disposable biosensor and biocatalysis of horseradish peroxidase based on sodium alginate film and room temperature ionic liquid. **Anal. Biochem.**, 378, 32–37, 2008.

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. 3rd ed. London: Longman, 1979. 116p.

D’ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clin. Chim. Acta**, 334, 41–69, 2003.

DUCROS, V.; BRZOWSKI, A. M.; WILSON, K. S.; OSTERGAARD, P.; SCHNEIDER, P.; SVENDSON, A.; DAVIES, G. J. Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different ‘type 2 Cu-depleted’ isoforms. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, 57, 333–336, 2001.

DUPONT, J.; SOUZA, R. F.; SUAREZ, P. A. Z. Ionic Liquid (Molten Salt) Phase Organometallic Catalysis. **Chem. Rev.**, 102, 3667–3692, 2002 A.

DUPONT, J.; FONSECA, G. S.; UMPIERRE, A. P.; FICHTNER, P. F. P.; TEIXEIRA, S. R. Transition-metal nanoparticles in imidazolium

ionic liquids: recyclable catalysts for biphasic hydrogenation reactions. **J. Am. Chem. Soc.**, 124, 4228–4229, 2002 B.

DUPONT, J. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. **J. Braz. Chem. Soc.**, 15, 341–350, 2004.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Appl. Catal. B**, 28, 83–99, 2000.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme Microb. Technol.**, 31, 907–931, 2002.

EARLE, M. J.; SEDDON, K. R. Ionic liquids: Green solvents for the future. **Pure Appl. Chem.**, 72, 1391–1398, 2000.

FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M.D. Biossensores. **Quim. Nova**, 15, 28–39, 1992.

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

FELIX, F. S.; YAMASHITA, M.; ANGNES, L. Epinephrine quantification in pharmaceutical formulations utilizing plant tissue biosensors. **Biosens. Bioelectron.**, 21, 2283–2289, 2006.

FELSE, P. A.; PANDA, T. Studies on applications of chitin and its derivatives. **Bioprocess Eng.**, 20, 505–512, 1999.

FERAPONTOVA, E. E.; GRIGORENKO, V. G.; EGOROV, A. M. P-chip and P-chip bienzyme electrodes based on recombinant forms of horseradish peroxidase immobilized on gold electrodes. **Biochemistry**, 66, 2001, 832–839.

FERNANDES, S. C.; OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. A green bean homogenate immobilized on chemically crosslinked chitin for determination of caffeic acid in white wine. **Enzyme Microb. Technol.**, 40, 661–668, 2007.

FERNANDES, S. C.; MOCCELINI, S. K.; SCHEEREN, C. W.; MIGOWSKI, P.; DUPONT, J.; HELLER, M. MICKE, G. A.; VIEIRA, I. C. Biosensor for chlorogenic acid based on an ionic liquid containing iridium nanoparticles and polyphenol oxidase. **Talanta**, 79, 222–228, 2009.

FERSHT, A. **Estructura y mecanismo de los enzimas**. Barcelona (Espanha): Reverte, 1980. 370 p.

FOTOPOULOU, M. A.; IOANNOU, P. C. Post-column terbium complexation and sensitized fluorescence detection for the determination of norepinephrine, epinephrine and dopamine using high-performance liquid chromatography. **Anal. Chim. Acta**, 462, 179–185, 2002.

FRANZOI, A. C.; MIGOWSKI, P.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Development of biosensors containing laccase and imidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ionic liquid for the determination of rutin. **Anal. Chim. Acta**, 639, 90–95, 2009 A.

FRANZOI, A. C.; DUPONT, J.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on laccase and an ionic liquid for determination of rosmarinic acid in plant extracts. **Talanta**, 77, 1322–1327, 2009 B.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖROS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors - sensor principles and architecture. **Sensors**, 8, 1400–1458, 2008.

GOMES, S. A. S. S.; NOGUEIRA, J. M. F.; REBELO, M. J. F. An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. **Biosens. Bioelectron.**, 20, 1211–1216, 2004.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapeutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 1436p.

GUILBAULT, G. G. **Analytical uses of immobilized enzymes**. New York: M.Dekker, 1984. 453p.

GUO, S. J.; WANG, E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. **Anal. Chim. Acta**, 598, 181–192, 2007.

GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman. **Carbohydr. Res.**, 341, 744–756, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2006. 1115 p.

HAKULINEN, N.; KIISKINEN, L.-L.; KRUUS, K.; SALOHEIMO, M.; PAANANEN, A.; KOIVULA, A.; ROUVINEN, J. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. **Nature Struct. Biol.**, 9, 601–605, 2002.

HAN, X.; ARMSTRONG, D.W. Ionic Liquids in Separations. **Acc. Chem. Res.**, 40, 1079–1086, 2007.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876 p.

HERNÁNDEZ, P.; SÁNCHEZ, I.; PATÓN, F.; HERNÁNDEZ, L. Cyclic voltammetry determination of epinephrine with a carbon fiber ultramicroelectrode. **Talanta**, 46, 985–991, 1998.

HERNÁNDEZ-SANTOS, D.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. B.; GARCÍA, A. C. Review: metal-nanoparticles based electroanalysis. **Electroanalysis**, 14, 1225–1235, 2002.

HOLBREY, J. D.; SEDDON, K. R. Ionic Liquids. **Clean Prod. Proc.**, 1, 223–236, 1999.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (IUBMB). Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>>. Acesso em: 04 janeiro 2010.

JIANRONG C.; YUQING M.; NONGYUE H.; XIAOHUA, W.; SIJIAO, L. Nanotechnology and biosensors. **Biotechnol. Adv.**, 22, 505–518, 2004.

KASAAI, M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. **Carbohydr. Polym.**, 71, 497–508, 2008.

KATZUNG, B. G. **Basic & clinical pharmacology**. 7th. ed. Stamford: Appleton & Lange, c1998. 1151p.

KOJŁO, A.; CALATAYUD, J. M. Spectrofluorimetric flow injection determination of adrenaline with an iodine solid-phase reactor. **Anal. Chim. Acta**, 308, 334–338, 1995.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilization: a review. **Enzyme Microb. Technol.**, 35, 126–139, 2004.

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Prog. Polym. Sci.**, 26, 1921–1971, 2001.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

LEITE, O. D.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C.; BARBOSA, A. M. Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. **Talanta**, 59, 889–896, 2003.

LIU, H.; HE, P.; LI, Z.; SUN, C.; SHI, L. J.; LIU, Y.; ZHU, G. Y.; LI, J. H. An ionic liquid-type carbon paste electrode and its polyoxometalate-modified properties. **Electrochem. Commun.**, 7, 1357–1363, 2005.

LIU, Y. M.; WANG, C. Q.; MU, H. B.; CAO, J. T.; ZHENG, Y. L. Determination of catecholamines by CE with direct chemiluminescence detection. **Electrophoresis**, 28, 1937–1941, 2007.

LIU, Y.; LIU, Z.; SHI, Y. Sensitive determination of epinephrine in pharmaceutical preparation by flow injection coupled with chemiluminescence detection and mechanism study. **Luminescence**, 2009. DOI 10.1002/bio.1186.

LOOMIS, W. D. Removal of phenolic compounds during the isolation of plant enzymes. **Methods Enzymol.**, 13, 555–563, 1969.

MALEKI, N.; SAFAVI, A.; TAJABADI, F. High-Performance carbon composite electrode based on an ionic liquid as a binder. **Anal. Chem.**, 78, 3820–3826, 2006.

MARTINEZ, L.; AGNELY, F.; LECLERC, B.; SIEPMANN, J.; COTTE, M.; GEIGER, S.; COUARRAZE, G. Cross-linking of chitosan and chitosan/poly(ethylene oxide) beads: a theoretical treatment. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 67, 339–348, 2007.

MATEO, J. V. G.; KOJLO, A. Flow-injection biamperometric determination of epinephrine. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 15, 1821–1828, 1997.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb. Technol.**, 40, 1451–1463, 2007.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, 60, 551–565, 2002.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, 77, 237–256, 2002.

MICHAŁOWSKI, J.; HAŁABURDA, P. Flow-injection chemiluminescence determination of epinephrine in pharmaceutical preparations using rawapple juice as enzyme source. **Talanta**, 55, 1165–1171, 2001.

MIGOWSKI, P.; DUPONT, J. Catalytic applications of metal nanoparticles in imidazolium ionic liquids. **Chem. Eur. J.**, 13, 32–39, 2007.

MIKKELSEN, S. R.; CORTÓN, E. **Bioanalytical Chemistry**. New Jersey: John Willey and Sons, 2004. 375p.

MINUSSI, R.C.; PASTORE, G.M.; DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends Food Sci. Technol.**, 13, 205–216, 2002.

MIR, V. G.; HEINÄMÄKI, J.; ANTIKAINEN, O.; REVOREDO, O. B.; COLARTE, A. I.; NIETO, O. M.; YLIRUUSI, J. Direct compression properties of chitin and chitosan. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 69, 964–968, 2008.

MOROZOVA, O. V.; SHUMAKOVICH, G. P.; SHLEEV, S. V.; YAROLOV, Y. I. Laccase–Mediator Systems and Their Applications: A Review. **Appl. Biochem. Microbiol.**, 43, 523–535, 2007.

MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. **React. Funct. Polym.**, 68, 1013–1051, 2008.

MUSAMEH, M.; WANG, J. Sensitive and stable amperometric measurements at ionic liquid-carbon paste microelectrodes. **Anal. Chim. Acta**, 606, 45–49, 2008.

MUZZARELLI, R. A. A.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G. W. **Chitin in nature and technology**. New York, London: Plenum, 1986. 583p.

NAGAHAMA, H.; NWE, N.; JAYAKUMAR, R.; KOIWA, S.; FURUIKE, T.; TAMURA, H. Novel biodegradable chitin membranes for tissue engineering applications. **Carbohydr. Polym.**, 73, 295–302, 2008.

NAGARAJA, P.; VASANTHA, R. A.; SUNITHA, K. R. A sensitive and selective spectrophotometric estimation of catechol derivatives in pharmaceutical preparations. **Talanta**, 55, 1039–1046, 2001.

NALEWAJKO, E.; WISZOWATA, A.; KOJŁO, A. Determination of catecholamines by flow-injection analysis and high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 43, 1673–1681, 2007.

NAYAK, M.; KOTIAN, A.; MARATHE, S.; CHAKRAVORTTY, D. Detection of microorganisms using biosensors – A smarter way towards detection techniques. **Biosens. Bioelectron.**, 25, 661–667, 2009.

NEVADO, J. J. B.; GALLEGU, J. M. L.; LAGUNA, P. B. Flow-injection spectrophotometric determination of adrenaline and dopamine with sodium hydroxide. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 14, 571–577, 1996.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on

chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 41, 366–372, 2006 A.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Immobilization procedures for the development of a biosensor for determination of hydroquinone using chitosan and gilo (*Solanum gilo*). **Enzyme Microb. Technol.**, 38, 449–456, 2006 B.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Quim. Nova**, 29, 932–939, 2006 C.

OLIVEIRA, I. R. W. Z. **Desenvolvimento de biossensores e sensores biomiméticos para determinação de compostos fenólicos**. 2007. 148 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2007.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Quim. Nova**, 25, 1012–1021, 2002.

PUMERA, M.; SÁNCHEZ, S.; ICHINOSE, I.; TANG, J. Electrochemical nanobiosensors. **Sens. Actuators B**, 123, 1195–1205, 2007.

REGALADO, C.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E.; DUARTE-VÁZQUEZ, M. A. Bio-technological applications of peroxidases. **Phytochem. Rev.**, 3, 243–256, 2004.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends Biotechnol.**, 24, 219–226, 2006.

RUZGAS, T.; CSÖREGI, E.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; VARGA, G.M. Peroxidase-modified electrodes: fundamentals and application. **Anal. Chim. Acta**, 330, 123–138, 1996.

SABBIONI, C.; SARACINO, M. A.; MANDRIOLI, R.; PINZAUTI, S.; FURLANETTO, S.; GERRA, G.; RAGGI, M. A. Simultaneous liquid chromatographic analysis of catecholamines and 4-hydroxy-3-

methoxyphenylethylene glycol in human plasma. Comparison of amperometric and coulometric detection. **J. Chromatogr. A**, 1032, 65–71, 2004.

SANTHIAGO, M.; VIEIRA, I. C. L-Cysteine determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on laccase from *Aspergillus oryzae*. **Sens. Actuators B**, 128, 279–285, 2007.

SCHEEREN, C. W.; MACHADO, G.; DUPONT, J.; FICHTNER, P. F. P.; TEIXEIRA, S. R. Nanoscale Pt(0) particles prepared in imidazolium room temperature ionic liquids: synthesis from an organometallic precursor, characterization and catalytic properties in hydrogenation reactions. **Inorg. Chem.**, 42, 4738–4742, 2003.

SCHEEREN, C. W.; DOMINGOS, J. B.; MACHADO, G.; DUPONT, J. Hydrogen reduction of Adams' catalyst in ionic liquids: formation and stabilization of Pt(0) nanoparticles. **J. Phys. Chem. C**, 112, 16463–16469, 2008.

SHAI DAROVA, L. G.; GEDMINA, A. V.; CHELNOKOVA, I. A.; BUDNIKOV, G. K. Determination of biogenic amines from electrocatalytic responses of graphite electrodes modified with metallic osmium or an osmium oxide-ruthenium cyanide film. **J. Anal. Chem.**, 63, 891–896, 2008.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., **Princípios de Análise Instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R., **Fundamentos de Química Analítica**. 8.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 999 p.

SOLICH, P.; POLYDOROU, C. H.; KOUPPARIS, M. A. Automated flow-injection spectrophotometric determination of catecholamines (epinephrine and isoproterenol) in pharmaceutical formulations based on ferrous complex formation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 22, 781–789, 2000.

SOROURADDIN, M. H.; MANZOORI, J. L.; KARGARZADEH, E.; SHABANI, A. M. H. Spectrophotometric determination of some catecholamine drugs using sodium bismuthate. **J. Pharm. Biomed.**

Anal., 18, 877–881, 1998.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A., Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Quim. Nova**, 26, 81–89, 2003.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1000 p.

SUN, Y.-X.; WANG, S.-F.; ZHANG, X.-H.; HUANG, Y.-F. Simultaneous determination of epinephrine and ascorbic acid at the electrochemical sensor of triazole SAM modified gold electrode. **Sens. Actuators B**, 113, 156–161, 2006.

ŠVANCARA, I.; VYTRÁS, K.; KALCHER, K.; WALCARIUS, A.; WANG, J. Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50-Years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis. **Electroanalysis**, 21, 7–28, 2009.

SZEPONIK, J.; MÖLLER, B.; PFEIFFER, D.; LISDAT F.; WOLLENBERGER, U.; MAKOWER, A.; SCHELLER, F.W. Ultrasensitive bienzyme sensor for adrenaline. **Biosens. Bioelectron.**, 12, 947–952, 1997.

TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors. **Mater. Sci. Eng. C**, 28, 1530–1543, 2008.

ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; YAMANAKA, H. Estudo do comportamento eletroquímico da enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e ácido 5-aminossalicílico. **Ecl. Quim.**, 33, 57–62, 2008.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, The Official Compendia of Standards, 2007, p. 2041.

VADGAMA, P.; CRUMP, P. W. Biosensors: recent trends – a review. **Analyst**, 117, 1657–1670, 1992.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, 65, 249–259, 2004.

VELASCO-GARCIA, M. N. Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. **Semin. Cell Dev. Biol.**, 20, 27–33, 2009.

VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using a crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*) as a source of peroxidase. **Analyst**, 123, 1809–1812, 1998.

VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*). **Quim. Nova**, 26, 39–43, 2003.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2nd. ed. New York: J. Wiley, 1995. 1360 p.

ZARE, H. R.; NASIRIZADEH, N. Simultaneous determination of ascorbic acid, adrenaline and uric acid at a hematoxylin multi-wall carbon nanotube modified glassy carbon electrode. **Sens. Actuators B**, 143, 666–672, 2010.

ZENG, J.; ZHENG, L.-Y. Studies on *Penicillium* sp. ZDZ1 chitosanase immobilized on chitin by cross-linking reaction. **Process Biochem.**, 38, 531–535, 2002.

ZHANG, X.; GUO, Q.; CUI, D. Recent Advances in Nanotechnology Applied to Biosensors. **Sensors**, 9, 1033–1053, 2009.

ZHAO, F.; WU, X.; WANG, M.; LIU, Y.; GAO, L.; DONG, S. Electrochemical and Bioelectrochemistry Properties of Room-Temperature Ionic Liquids and Carbon Composite Materials. **Anal. Chem.**, 76, 4960–4967, 2004.

ZHOU, Y. Recent advances in ionic liquids for synthesis of inorganic nanomaterials. **Curr. Nanosci.**, 1, 35–42, 2005.

ZHOU, Y. Z.; ZHANG, L. J.; CHEN, S. L.; DONG, S. Y.; ZHENG, X. H. Electroanalysis and simultaneous determination of dopamine and epinephrine at poly(isonicotinic acid)-modified carbon paste electrode in the presence of ascorbic acid, **Chin. Chem. Lett.**, 20, 217–220, 2009.

ZHU, M.; HUANG, X.; LI, J.; SHEN, H. Peroxidase-based spectrophotometric methods for the determination of ascorbic acid, norepinephrine, epinephrine, dopamine and levodopa. **Anal. Chim. Acta.**, 357, 261–267, 1997.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. New York: J. Wiley, VCH, 1994. 108p.

WANG, S.-F.; DU, D.; ZOU, Q.-C. Electrochemical behavior of epinephrine at l-cysteine self-assembled monolayers modified gold electrode. **Talanta**, 57, 687–692, 2002.

WANG, S. F.; XIONG, H. Y.; ZENG, Q. X. Design of carbon paste biosensors based on the mixture of ionic liquid and paraffin oil as a binder for high performance and stabilization. **Electrochem. Commun.**, 9, 807–812, 2007.

WEETALL, H. H. **Immobilized enzyme technology: research and applications**. New York: Plenum, 1975. 321p.

WEI, S.; SONG, G.; LIN, J.-M. Separation and determination of norepinephrine, epinephrine and isoprenaline enantiomers by capillary electrophoresis in pharmaceutical formulation and human serum. **J. Chromatogr. A**, 1098, 166–171, 2005.

WEI, D.; IVASKA, A. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors. **Anal. Chim. Acta**, 607, 126–135, 2008.