

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE PROCEDIMENTOS
ENVOLVENDO REAÇÕES QUIMILUMINESCENTES EM FLUXO
PARA A DETERMINAÇÃO DE ANALITOS DE INTERESSE
ALIMENTÍCIO, FARMACÊUTICO E BIOQUÍMICO**

OLDAIR DONIZETI LEITE*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para a obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS (área QUÍMICA ANALÍTICA)

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

***Bolsista da FAPESP**

SÃO CARLOS – SP

2005

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

L533da

Leite, Oldair Donizeti.

Desenvolvimento e aplicação de procedimentos envolvendo reações quimiluminescentes em fluxo para a determinação de analitos de interesse alimentício, farmacêutico e bioquímico / Oldair Donizeti Leite. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

135 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Métodos óticos. 2. Quimiluminescência. 3. Análise por injeção de fluxo. 4. Peróxido de hidrogênio. 5. Luminol. I. Título.

CDD: 543.085 (20^a)

"A luz do vaga-lume quase não pode ser vista de dia, mas com o por do sol sim. Ela pode ser vista ainda melhor a meia noite. As coisas são assim. A vida, as vezes parece feita de momentos de escuridão, mas a verdade é que nestes momentos conseguimos enxergar melhor a luz"

Ryuhō Okawa

Agradecimentos

- Ao amigo e orientador Orlando Fatibello Filho, pela alegria e entusiasmo de vida, pela orientação e discussão profissional e pessoal;
- À minha mãe Rosa, meu pai Horácio (in memória), meus irmãos (Cida, Rose, Vânia, Vani e André), pelo apoio, amor e carinho;
- À Luci, minha amada e companheira de todos os momentos;
- Ao amigo Fábio, pelo apoio, incentivo inicial e valiosíssima ajuda, para a realização deste trabalho;
- Ao amigo Newton (FAC) pelo profissionalismo e ajuda na montagem do sistema de detecção;
- Aos amigos (irmãos) Heberth, Marcos e Edivan, pela amizade, troca de idéias e apoio no desenvolvimento deste trabalho;
- Aos amigos Fernando, Moacir, Ronaldo, Nelson, Humberto, Carla, Josué, Rogério e Soninha, pelo convívio diário, troca de idéias e ajuda nos momentos difíceis;
- Aos queridos amigos Karina, André, Gabriel e mais recentemente Miguel, pela ajuda e carinho, sempre de portas abertas a me receber;

- Aos Professores Eduardo A. Neves, Joaquim A. Nóbrega, Ivani A. Carlos, Ronaldo C. Faria e Ana Rita de A. Nogueira, pelos ensinamentos e valiosas discussões.
- Aos amigos do LABBES, Renata, Luis, Viviane, Willian, Geiser, Fernanda, Dani, Larissa, Ana Elisa, Mirella, Cyber, Bruno, Bruna e Alexandro, pela prazerosa convivência;
- Ao Ademir e Jose Roberto pelo profissionalismo e atenção, proporcionada para a realização deste trabalho;
- Aos amigos dos laboratórios de analítica, orgânica, físico-química e inorgânica do Depto de Química da UFSCar e do laboratório de analítica da Embrapa Pecuária Sudeste;
- À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós-Graduação em Química, pela oportunidade;
- À CAPES, FAPESP e a sociedade brasileira, pela bolsa e financiamento dos estudos;
- À todos aqueles, que tive o privilégio de conhecer e conviver durante estes anos de doutorado, que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado,

Muitíssimo Obrigado.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL	1
1 - Luminescência	2
1.2 - Enzimas	5
1.3 - Sistemas de análises em fluxo e multicomutação	7
CAPÍTULO 2 – ESTUDOS PRELIMINARES DA REAÇÃO QUIMILUMINESCENTE EMPREGANDO O MÓDULO DE ANÁLISE E DETECÇÃO DESENVOLVIDOS	9
2 - Objetivos	10
2.1 - Introdução	10
2.2 - Parte Experimental	14
2.2.1 - Descrição geral do sistema	14
2.2.2 - Módulo de detecção	16
2.2.3 – Reagentes e soluções	17
2.2.4 – Procedimento Experimental	19
2.2.4.1 - Reação quimiluminescente	19
2.2.4.2 - Diagrama de fluxos e procedimento	19
2.3 – Resultados e Discussão	22
2.3.1- Avaliação da estabilidade da solução de luminol	22
2.3.2 – Avaliação da cela de reação e medida da reação quimiluminescente construída em polietileno	24
2.3.3 – Avaliação do efeito de catalisadores em diferentes condições reacionais	25
2.3.4 – Otimização do módulo de análise empregando o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ como catalisador na reação quimiluminescente para a determinação de peróxido de hidrogênio em amostras comerciais	28
2.3.4.1 – Efeito da concentração da solução de luminol	28
2.3.4.2 – Efeito da concentração da solução de hexacianoferrato (III) de potássio	29

2.3.4.3 – Efeitos do volume dos reagentes em diferentes vazões sobre sinal analítico	30
2.3.4.4 – Características analíticas do sistema	32
2.3.4.5 – Estudo de adição e recuperação de peróxido de hidrogênio em amostras comerciais	35
2.3.4.6 – Determinação de peróxido em amostras comerciais empregando o sistema em fluxo com detecção quimiluminescente	36
2.4 - Conclusões	37
CAPÍTULO 3 – PROCEDIMENTO ANALÍTICO EM FLUXO COM DETECÇÃO QUIMILUMINESCENTE PARA A DETERMINAÇÃO DE GLICOSE EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS E BIOQUÍMICAS	38
3 - Objetivos	39
3.1 – Revisão Bibliográfica	39
3.2 – Parte Experimental	43
3.2.1 – Princípio do método	44
3.2.2 - Equipamentos e acessórios	44
3.2.3 – Reagentes e soluções	44
3.2.3.1 – Reagentes e soluções empregados no estudo da imobilização da enzima glicose oxidase	44
3.2.3.2 – Reagentes e soluções empregados na otimização do procedimento em fluxo para a detecção de glicose	45
3.2.3.3 – Preparo das amostras de mel, suco e soro glicosado	46
3.2.3.4 – Preparo de amostras de plasma sanguíneo	46
3.2.4 – Procedimento Experimental	46
3.2.4.1 – Imobilização da glicose oxidase	46
3.2.4.2 – Diagrama do módulo de análise em fluxo para a determinação quimiluminescente de glicose em sucos , mel e soro glicosado	48
3.2.4.3 – Diagrama do módulo de análise em fluxo para a determinação quimiluminescente de glicose em plasma sanguíneo	50

3.2.4.4 – Método comparativo	52
3.3 – Resultados e discussão	53
3.3.1 – Resultados dos estudos da imobilização da glicose oxidase no suporte de sílica	53
3.3.2 – Resultados obtidos com o módulo de análise para a determinação de glicose em mel, soro glicosado, suco de uva e suco de tomate	60
3.3.3 – Determinação de glicose em plasma sanguíneo	70
3.3.3.1 – Estudo de adição e recuperação de glicose em plasma	75
4.0 – Conclusões	76
CAPÍTULO 4 - PROCEDIMENTO ANALÍTICO EM FLUXO COM DETECÇÃO QUIMILUMINESCENTE PARA A DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS E BIOQUÍMICAS	77
4 Objetivos	78
4.1 Revisão Bibliográfica	78
4.2 Parte Experimental	81
4.2.1 – Equipamentos e acessórios	82
4.2.2 - Reagentes e soluções	83
4.2.2.1 – Reagentes e soluções empregados na imobilização das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase	83
4.2.2.2 – Reagentes e soluções empregados na otimização do procedimento em fluxo para a determinação de colesterol	84
4.2.2.3 – Preparo das amostras de ovos	85
4.2.2.4 – Preparo das amostras de plasma sanguíneo	86
4.2.3 – Procedimento Experimental	86
4.2.3.1 - Imobilização enzimática	86
4.2.3.2 – Diagrama do módulo de análise em fluxo para a determinação quimiluminescente de colesterol em ovos	87
4.2.3.3 – Diagrama do módulo de análise em fluxo para a determinação	

quimiluminescente de colesterol em plasma sanguíneo	88
4.2.3.4 – Método comparativo	89
4.3 - Resultados e discussão	90
4.3.1 – Resultados obtidos na imobilização das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase	90
4.3.2 – Resultados obtidos com o módulo de análise para a determinação de colesterol em ovos.	90
4.3.3- Resultados obtidos com o módulo de análise para a determinação de colesterol em plasma sanguíneo	99
4.4 - Conclusões	108
CAPÍTULO 5 - Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras	109
CAPÍTULO 6 - Referências Bibliográficas	111
APENDICE - PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO E PRÉ-PURIFICAÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE (CATALISADOR DA REAÇÃO QUIMILUMINESCENTE)	118

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1- Esquema do mecanismo de reação do luminol com H_2O_2 em meio alcalino e na presença de um metal de transição M^{n+} como catalisador proposto por Albertin *et al.*⁹ Intermediários: (I) diazoquinona, (II) ânion de peróxido de hidrogênio, (III e IV) endo-peróxido e (V) 3-aminoftalato----- 4
-
- Figura 2.1 – Distribuição percentual dos procedimentos analíticos em fluxo com detecção quimiluminescente, para diferentes amostras (2000 –2005). Fonte:www.webofscience.com. Expressões de busca: flow injection analysis and chemiluminescence or flow analysis and chemiluminescence or multicommutation and chemiluminescence----- 13
-
- Figura 2.2 - Formulário (tela) empregada para interface com o usuário----- 15
-
- Figura 2.3- Fotos da cela de fluxo (A e B) construídas, empregando tubo de polietileno (diâmetro interno de 0,8 mm) enrolado em espiral----- 16
-
- Figura 2.4 – Fotos do módulo de detecção construído, empregando um fotodiodo de silício e a cela de medida de polietileno em espiral, para o monitoramento da radiação quimiluminescente 17
- Figura 2.5 – Esquema de reação do luminol em meio alcalino na presença de um catalisador para geração da quimiluminescência----- 19
-
- Figura 2.6 – Diagrama de fluxos do sistema empregado para estudo da reação quimiluminescente e determinação de peróxido de hidrogênio. C- carregador H_2O ; A – soluções padrões de peróxido e/ou amostras; R_1 – solução de luminol; R_2 – solução de ferricianeto de potássio; V_1 – V_4 – válvulas solenóides de 3 vias ; L – luminômetro construído com fotodiodo de silício contendo uma cela em espiral, polietileno, de 100 cm; D – descarte; x – ponto de confluência----- 20
-
- Figura 2.7 – Monitoramento do sinal analítico da reação quimiluminescente, empregando a solução de luminol $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$: ■ preparado há 3 dias; ● recém preparada, empregando o sistema em fluxo (Fig. 2.6) nas seguintes condições: R_1 = soluções de luminol $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$, R_2 = solução de peróxido de hidrogênio $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; R_3 = solução de ferricianeto de potássio $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$, C = água; vazão das soluções $3,0 \text{ mL min}^{-1}$; tempo de acionamento das válvulas V_1 - V_4 por determinação = $4,0 \text{ s}$ ----- 23
-
- Figura 2.8- Fotografia mostrando emissão de luz da cela preenchida pelos reagentes empregados na determinação de H_2O_2 por quimiluminescência---- 25
-
- Figura 2.9- Influência dos catalisadores na magnitude da luminescência da reação luminol/ H_2O_2 /catalisador em diferentes condições reacionais (pH 9,1, 10,1 e 11,0), empregando o sistema em fluxo (Fig. 2.6) nas seguintes condições: R_1 = soluções de luminol $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$, R_2 = solução de peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; R_3 = solução de ferricianeto de potássio $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$, C = água; vazão das soluções $3,0 \text{ mL min}^{-1}$; tempo de

acionamento das válvulas V_1 - V_4 por determinação = 4,0 s----- 27

Figura 2.10 – Efeito da concentração de luminol sobre o sinal analítico empregando o sistema em fluxo (Fig. 2.6) nas seguintes condições: R_1 = soluções de luminol 0,5 – 4,0 mmol L⁻¹, R_2 = solução de peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; R_3 = solução de ferricianeto de potássio 20,0 mmol L⁻¹, C = água; vazão das soluções 3,0 mL min⁻¹; tempo de acionamento das válvulas V_1 - V_4 por determinação = 4,0 s----- 28

Figura 2.11 – Efeito da concentração de hexacianoferrato de potássio sobre o sinal analítico empregando o sistema em fluxo (Fig. 2.6) nas seguintes condições: R_1 = soluções de luminol 2,5 mmol L⁻¹, R_2 = solução de peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; R_3 = solução de ferricianeto de potássio 0,5 – 50,0 mmol L⁻¹, C = água; vazão das soluções 3,0 mL min⁻¹; tempo de acionamento das válvulas V_1 - V_4 por determinação = 4,0 s.----- 29

--
Figura 2.12 – Efeito do volume da mistura reacional (diferentes tempos de acionamento das válvulas em diferentes vazões). Os estudos foram realizados empregando o sistema em fluxo (Fig. 2.6) nas seguintes condições: R_1 = soluções de luminol 2,5 mmol L⁻¹, R_2 = solução de peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; R_3 = solução de ferricianeto de potássio 10,0 mmol L⁻¹, C = água; vazão das soluções 2,4 – 3,6 mL min⁻¹; tempo de acionamento das válvulas V_1 - V_4 por determinação = 2,0 - 6,0 s----- 31

--
Figura 2.13 - Curva analítica para soluções de H₂O₂ entre $2,2 \times 10^{-6}$ a $4,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹----- 32

--
Figura 2.14 – Sinais transientes referentes às determinações de soluções padrões de H₂O₂ (1-10) de $2,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $4,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹----- 33

--
Figura 2.15 – Estudo da repetibilidade dos sinais analíticos para as soluções padrões de H₂O₂ A : $7,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e B: $6,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹----- 33

--
Figura 3.1 – Etapas envolvidas na imobilização da glicose oxidase em sílica de porosidade controlada (CPG)----- 47

-
Figura 3.2 – Módulo de análise em fluxo para a determinação de glicose: válvulas solenóides de três vias: V_1 = controle da solução transportadora C (solução tampão fosfato 0,025 mol L⁻¹ pH 7,5; V_2 = controle de injeção da solução de amostra e/ou padrões de glicose; V_4 = controle da solução de luminol e V_5 = controle da solução de hexacianoferrato (III) de potássio; ponto de confluência = y; coluna enzimática = GOD e sistema de detecção quimiluminescente DET----- 49

--
Figura 3.3 – Módulo de análise em fluxo para a determinação de glicose: válvulas solenóides de três vias: V_1 = controle da solução transportadora C (solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,5); V_2 e V_3 = controle da solução de amostra e/ou padrões de glicose; V_4 = controle da solução de luminol e V_5 = controle da solução de hexacianoferrato (III) de potássio; pontos de confluência = x e y; coluna enzimática = GOD e sistema de detecção

quimiluminescente DET)-----	51
--	
Figura 3.4 - Gráfico de pareto obtido da análise das variáveis estudadas e suas interações-----	54
--	
Figura 3.5- Teores de proteína imobilizada (mg de proteína/g de sílica) empregando diferentes concentrações de reagentes (A) e tempos de reação (B).-----	55
--	
Figura 3.6 - Gráfico de relevância das variáveis estudadas e suas interações-----	56
Figura 3.7. Quantidade de proteína imobilizada (mg de proteína/g de sílica) empregando diferentes concentrações de ATPS (1,5 e 3,5% v/v) e tempos de imobilização da enzima de 2 e 6h-----	57
--	
Figura 3.8- Representação da interação entre ATPS e tempo de contato da proteína.-----	58
Figura 3.9. Modelo matemático da imobilização da proteína em diferentes concentrações de ATPS e o tempo de imobilização-----	59
-	
Figura 3.10 – Efeito do volume da amostra inserida no percurso analítico, sobre a magnitude do sinal. (V ₁) 0,1 mol L ⁻¹ de solução tampão fosfato pH 7,0 na vazão de 2,0 mL min ⁻¹ ; (V ₂) 9,5 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de solução de glicose na vazão de 3,0 mL min ⁻¹ ; (V ₃ e V ₄) 2,5 mmol L ⁻¹ de solução de luminol e 10,0 mmol L ⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min ⁻¹ (t _{acionam.} 10 s).-----	61

Figura 3.11 – Efeito do volume dos reagentes R1 (luminol) e R2 (hexacianoferrato (III) de potássio) inseridos no percurso analítico, sobre a magnitude do sinal. (V ₁) 0,1 mol L ⁻¹ de solução tampão fosfato pH 7,0 na vazão de 2,0 mL min ⁻¹ ; (V ₂) 9,5 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ da solução de glicose, (t _{acionam.} 4 s), na vazão de 3,0 mL min ⁻¹ ; (V ₃ e V ₄) 2,5 mmol L ⁻¹ de solução de luminol e 10,0 mmol L ⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min ⁻¹ -----	62
--	
Figura 3.12 – Efeito do pH da solução transportadora sobre o sinal analítico. (V ₁) 0,1 mol L ⁻¹ de solução tampão fosfato (pH 5,5 – 8,0) na vazão de 2,0 mL min ⁻¹ ; (V ₂) 9,5 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de solução de glicose na vazão de 3,0 mL min ⁻¹ (t _{acionam.} 4 s); (V ₃ e V ₄) 2,5 mmol L ⁻¹ de solução de luminol e 10,0 mmol L ⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min ⁻¹ (t _{acionam.} 8 s)-----	63
--	
Figura 3.13 - Curva analítica obtida para as soluções de glicose entre 5,0 a 160 mg L ⁻¹ . V ₁) 25,0 mmol L ⁻¹ de solução tampão fosfato (pH 7,0 na vazão de 2,0 mL min ⁻¹ ; (V ₂) soluções padrões de glicose na vazão de 3,0 mL min ⁻¹ (t _{acionam.} 4 s); (V ₃ e V ₄) 2,5 mmol L ⁻¹ de solução de luminol e 10,0 mmol L ⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min ⁻¹ (t _{acionam.} 8 s)-----	65
--	

Figura 3.14 – Sinais transientes obtidos com as soluções padrões de glicose de 5,0 a 160 mg L ⁻¹ . (V ₁) 25,0 mmol L ⁻¹ de solução tampão fosfato (pH 7,0 na vazão de 2,0 mL min ⁻¹ ; (V ₂) soluções padrões de glicose na vazão de 3,0 mL min ⁻¹ (t _{acionam.} 4 s); (V ₃ e V ₄) 2,5 mmol L ⁻¹ de solução de luminol e 10,0 mmol L ⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min ⁻¹ (t _{acionam.} 8 s)-----	66
--	
Figura 3.15 – Sinais transientes obtidos para uma solução de glicose 130 mg L ⁻¹ empregando o modulo de análise em fluxo com detecção por quimiluminescência-----	66
-	
Figura 3.16 – (a) Sinais transientes em triplicata obtidas na análise do suco de uva por adição de padrão, (b) curva analítica da adição de padrão para determinação de glicose em suco de uva -----	69
--	
Figura 3.17 – (a) Sinais transientes em triplicata obtidas na análise do suco de tomate por adição de padrão, (b) curva analítica da adição de padrão para determinação de glicose em suco de tomate-----	69

Figura 3.18 - Efeito do tempo de “delay” para o acionamento das válvulas (V4 e V5) após a introdução da amostra no percurso analítico. Alça de amostragem L1 de 25,0 µL; Carregador: 25,0 mmol L ⁻¹ de solução tampão fosfato (pH 7,0 na vazão de 2,0 mL min ⁻¹ ; (V4 e V5) 2,5 mmol L ⁻¹ de solução de luminol e 10,0 mmol L ⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min ⁻¹ (t _{acionam.} 8 s). -----	71
--	
Figura 3.19 - Intensidade do sinal analítico em função do tempo de acionamento das válvulas V4 (luminol) e V5 (hexacianoferrato III) para diferentes concentrações de glicose. Alça de amostragem L1 de 25,0 µL; Carregador: 25,0 mmol L ⁻¹ de solução tampão fosfato (pH 7,0 na vazão de 2,0 mL min ⁻¹ ; (V4 e V5) 2,5 mmol L ⁻¹ de solução de luminol e 10,0 mmol L ⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min ⁻¹ (t _{acionam.} 8 s) -----	72

Figura 3.20 - Curva analítica obtida para as soluções de glicose entre 100,0 a 1000 mg L ⁻¹ . Carregador: 25,0 mmol L ⁻¹ de solução tampão fosfato (pH 7,0 na vazão de 2,0 mL min ⁻¹ ; (L ₁) alça de amostragem de 25,0 µL; (V ₃ e V ₄) 2,5 mmol L ⁻¹ de solução de luminol e 10,0 mmol L ⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min ⁻¹ (t _{acionam.} 3s).-----	74
--	
Figura 3.21 – (a) Sinais transientes em quintuplicata obtida para os padrões de glicose de 100 a 1000 mg L ⁻¹ -----	74
--	
Figura 4.1 - Mecanismo da reação para a determinação do colesterol total em amostras de soro sanguíneo-----	82

--

Figura 4.2 - Diagrama de fluxos do módulo de análise para a determinação de colesterol em ovos: válvulas solenóides de três vias: V_1 = controle da solução transportadora C (solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0); V_2 e V_3 = controle da solução de amostra e/ou padrões de colesterol; V_4 = controle da solução de luminol e V_5 = controle da solução de hexacianoferrato (III) de potássio. Pontos de confluência y, L_1 = alça de amostragem, coluna enzimática = COD e sistema de detecção quimiluminescente DET----- 87

Figura 4.3 - Diagrama de fluxos do módulo de análise para a determinação de colesterol em plasma: válvulas solenóides de três vias: V_1 = controle da solução transportadora C (solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0); V_2 e V_3 = controle da solução de amostra e/ou padrões de colesterol; V_4 = controle da solução de luminol e V_5 = controle da solução de hexacianoferrato (III) de potássio. Pontos de confluência x e y, L_1 = alça de amostragem, B_1 = bobina de mistura e diluição de 25 cm, coluna enzimática = CE (colesterol esterase), coluna enzimática = COD (colesterol oxidase) e sistema de detecção quimiluminescente DET----- 89

Figura 4.4. – Influência do volume da alça de amostragem sobre o sinal analítico, empregando o módulo de análise apresentada na Figura 4.2. (V_1) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato pH 7.0 na vazão de $2,4 \text{ mL min}^{-1}$; (V_2 e V_3) preenchimento da alça de amostragem L_1 (50 a $150 \mu\text{L}$) com solução de colesterol 500 mg L^{-1} ($t_{\text{acionam.}}$ 30s); tempo de delay para acionamentos das válvulas V_3 e V_4 de 10s; (V_3 e V_4) $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de solução de luminol e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{acionam.}}$ 10 s). 91

Figura 4.5. – Influência da vazão do fluxo carregador sobre o sinal analítico, empregando o módulo e análise Figura 4.2. (V_1) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato pH 7.0 em diferentes vazões $1,9$ a $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ (V_2 e V_3) preenchimento da alça de amostragem L_1 ($125,0 \mu\text{L}$) com solução de colesterol 500 mg L^{-1} ($t_{\text{acionam.}}$ 30s); tempo de delay de (6 a 18 s); (V_3 e V_4) $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de solução de luminol e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{acionam.}}$ 10 s).----- 92

--

Figura 4.6 – Efeito da concentração de luminol sobre o sinal analítico, empregando o módulo e análise Figura 4.2. (V_1) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato pH 7.0 a $2,4 \text{ mL min}^{-1}$ (V_2 e V_3) preenchimento da alça de amostragem L_1 ($125,0 \mu\text{L}$) com solução de colesterol 500 mg L^{-1} ($t_{\text{acionam.}}$ 30s); tempo de delay de (10 s); (V_3 e V_4) $1,0$ a $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de solução de luminol e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{acionam.}}$ 10 s).----- 93

--

Figura 4.7 – Efeito da concentração de hexacianoferrato (III) de potássio sobre o sinal analítico empregando o módulo de análise apresentado na Figura 4.2. (V_1) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato pH 7.0 a $2,4 \text{ mL min}^{-1}$; (V_2 e V_3) preenchimento da alça de amostragem L_1 ($125,0 \mu\text{L}$) com solução de colesterol 500 mg L^{-1} ($t_{\text{acionam.}}$ 30s); tempo de delay de (10 s); (V_3 e V_4)

5,0 mmol L⁻¹ de solução de luminol e 5,0 a 50,0 mmol L⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min⁻¹ (t_{acionam.} 10 s).----- 94

--

Figura 4.8 – Influência da concentração hidrogeniônica sobre o sinal analítico. (V₁) 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato pH 6,5 a 8,0 a 2,4 mL min⁻¹; (V₂ e V₃) preenchimento da alça de amostragem L₁ (125,0 µL) com solução de colesterol 500 mg L⁻¹ (t_{acionam.} 30s); tempo de delay de (10 s); (V₃ e V₄) 5,0 mmol L⁻¹ de solução de luminol e 20,0 mmol L⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min⁻¹ (t_{acionam.} 10 s)----- 95

--

Figura 4.9 – Efeito do volume dos reagentes R1 (luminol) e R2 (hexacianoferrato (III) de potássio) inseridos no percurso analítico, sobre a magnitude do sinal. (V₁) 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato pH 7,0 a 2,4 mL min⁻¹; (V₂ e V₃) preenchimento da alça de amostragem L₁ (125,0 µL) com solução de colesterol 500 mg L⁻¹ (t_{acionam.} 30s); tempo de delay de (10 s); (V₃ e V₄) 5,0 mmol L⁻¹ de solução de luminol e 20,0 mmol L⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min⁻¹ (t_{acionam.} 5 a 10 s)----- 96

--

Figura 4.10 – Curva analítica obtida para as soluções de colesterol 250,0 a 2500 mg L⁻¹. (V₁) 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato pH 7,0 a 2,4 mL min⁻¹; (V₂ e V₃) preenchimento da alça de amostragem L₁ (125,0 µL) com solução padrões e/ou amostras (t_{acionam.} 30s); tempo de delay de (10 s); (V₃ e V₄) 5,0 mmol L⁻¹ de solução de luminol e 20,0 mmol L⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min⁻¹ (t_{acionam.} 8 s).----- 98

--

Figura 4.11 – Sinais transientes em triplicata obtidos para os padrões de colesterol de 250; 500; 750; 1200; 1500; 2016 e 2520 mg L⁻¹, empregando o módulo de análise nas condições otimizadas apresentadas da Tabela 4.1.--- 98

--

Figura 4.12 - Efeito da vazão da solução carregadora e do tempo de “delay” para o acionamento das válvulas (V₄ e V₅) após a introdução dos padrões e/ou amostra no percurso analítico. Alça de amostragem L₁ de 50,0 µL; Bobina de mistura e/diluição B₁ de 25 cm; V₁ = solução tampão fosfato pH 7,0 (carregador) nas vazões de 1,2 a 2,4 mL min⁻¹; (V₂ e V₃) solução de colesterol 1250,0 mg L⁻¹; tempo de delay de 8 a 16 s; (V₄ e V₅) 5,0 mmol L⁻¹ de solução de luminol e 20,0 mmol L⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min⁻¹ (t_{acionam.} 8 s).----- 101

Figura 4.13 – Magnitude do sinal analítico em função do tempo de acionamento das válvulas V₄ (luminol) e V₅ (hexacianoferrato III) para diferentes concentrações de colesterol, empregando o módulo de análise nas seguintes condições. Alça de amostragem L₁ de 50,0 µL; Bobina de mistura e/diluição B₁ de 25 cm; V₁ = solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH

7,0 (carregador) na vazão de 1,8 mL min⁻¹; (V₂ e V₃) solução de colesterol 500 mg L⁻¹ a 4000 mg L⁻¹; tempo de delay de 14 s; (V₄ e V₅) 5,0 mmol L⁻¹ de solução de luminol e 20,0 mmol L⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min⁻¹ (t_{acionam.} 6 a 10 s).--- 102

--

Figura 4.14 - Curva analítica obtida para as soluções de colesterol 500,0 a 4000 mg L⁻¹, empregando o módulo de análise da Figura 4.3 nas seguintes condições: Alça de amostragem L₁ de 50,0 µL; Bobina de mistura e/diluição B₁ de 25 cm; V₁ = solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 (carregador) na vazão de 1,8 mL min⁻¹; (V₂ e V₃) solução de colesterol 500 mg L⁻¹ a 4000 mg L⁻¹; tempo de delay de 14 s; (V₄ e V₅) 5,0 mmol L⁻¹ de solução de luminol e 20,0 mmol L⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min⁻¹ (t_{acionam.} 8 s).----- 105

--

Figura 4.15 - Registro dos sinais transientes referentes à determinação de colesterol com soluções de referências entre 500 e 4000 mg L⁻¹ de colesterol empregando o módulo de análise nas condições descritas na Figura 4.14. 106

Figura A.1 – Papel de filtro Whatman nº 1 quadriculado (1cm x 1cm) e numerado, empregado no “screening” para verificar a presença da atividade da peroxidase nas respectivas frações.----- 128

--

Figura A.2 – Atividade da peroxidase POD (Unidades mL⁻¹) dos extratos de abobrinha, batata doce e raiz forte obtidos empregando-se diferentes métodos de extração ER, EM1 e EM2, respectivamente----- 129

-

Figura A.3 – Atividade da polifenol oxidase PFO (Unidades mL⁻¹) dos extratos de abobrinha, batata doce e raiz forte utilizando diferentes métodos de extração ER, EM1 e EM2----- 130

Figura A.4 – Precipitação da enzima peroxidase, obtida do extrato da batata doce em diferentes (%) de saturação com sulfato de amônio----- 131

-

Figura A.5 – Sistema cromatográfico para purificação de enzimas, constituído de coletor de frações e coluna cromatográfica contendo gel Sephadex G-100. 133

Figura A.6 – Fracionamento da peroxidase da batata doce em gel (Sephadex G-100 (2,5 x 70 cm)): Volume das frações de 5,0 mL; ■ monitoramento da peroxidase (U/ mL); ● monitoramento das proteínas (absorbância 280 nm).--- 134

TABELA 2.1 – Esquema de acionamento das válvulas solenóides para a determinação de peróxido de hidrogênio, diagrama de fluxo Figura 5-----	21
-	
TABELA 2.2 - Efeito do comprimento da cela sobre o sinal analítico empregando, R ₁ = soluções de luminol 3,0 mmol L ⁻¹ , R ₂ = solução de peróxido de hidrogênio 1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ ; R ₃ = solução de ferricianeto de potássio 20,0 mmol L ⁻¹ , C = água; vazão das soluções 3,0 mL min ⁻¹ ; tempo de acionamento das válvulas V ₁ -V ₄ por determinação = 4,0 s-----	24

TABELA 2.3 – Estudo da otimização do sistema em fluxo empregado na determinação de peróxido de hidrogênio-----	31
--	
TABELA 2.4 – Características analíticas do sistema em fluxo para determinação de peróxido de hidrogênio por quimiluminescência, empregando fotiodo como detecto-----	34
--	
TABELA 2.5 - Estudo de adição e recuperação de peróxido de hidrogênio em amostras de cremes comerciais-----	35

TABELA 3.1- Planejamento fatorial com valores reais das variáveis concentração de ATPS, tempo 1 (reação da sílica com ATPS), concentração de glutaraldeído e tempo 2 (reação da sílica silanizada com glutaraldeído)---	48
--	
Tabela 3.2- Resultados obtidos no estudo do Planejamento Fatorial, expresso em quantidade de proteína imobilizada/grama de sílica, tempos de imobilização de 2 e 6 horas-----	53
--	
TABELA 3.3 – Parâmetros estudados na otimização do sistema em fluxo com o reator contendo glicose oxidase imobilizada-----	64

TABELA 3.4– Estudo de adição e recuperação de glicose em amostras de mel, suco de uva e tomate-----	67
-	
TABELA 3.5 - Determinação do teor de glicose em amostras de mel, karo, soro glicosado, suco de uva e de tomate pelo método proposto e pelo método comparativo-----	68

TABELA 3.6 – Estudo de adição e recuperação de glicose em amostras de plasma sanguíneo-----	75
--	
TABELA 3.7 - Determinação do teor de glicose em amostras de plasma sanguíneo pelo método proposto e pelo método comparativo-----	76
--	
TABELA 4.1 – Parâmetros estudados na otimização do sistema em fluxo utilizado na determinação de colesterol em ovos-----	97
-	
TABELA 4.2- Determinação do teor de colesterol em amostras de ovos pelo método proposto e pelo método comparativo (Kit enzimático)-----	99
-	

TABELA 4.3 – Efeito de algumas espécies químicas como potenciais interferentes na determinação do colesterol total em plasma sanguíneo-----	104
--	
TABELA 4.4 – Procedimentos analíticos em fluxo empregados para a determinação de colesterol em amostras clínicas-----	107
--	
TABELA 4.5 - Resultados obtidos na determinação de colesterol total em amostras de plasma sanguíneo empregando o sistema proposto e o método comparativo ⁷⁹ -----	107
--	
TABELA A1 – Perfil de purificação da enzima peroxidase obtida da batata doce, nas diferentes etapas estudadas-----	135
--	

Resumo

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE PROCEDIMENTOS ENVOLVENDO REAÇÕES QUIMILUMINESCENTES EM FLUXO PARA A DETERMINAÇÃO DE ANALÍTOS DE INTERESSE ALIMENTÍCIO, FARMACÊUTICO E BIOQUÍMICO

No presente trabalho, foram desenvolvidos procedimentos analíticos em fluxo empregando o conceito de multicomutação e detecção por quimiluminescência para a determinação de peróxido de hidrogênio, glicose e colesterol em amostras alimentícias, bioquímicas e farmacêuticas. Para o controle do módulo de análise e a aquisição de dados foi empregado um microcomputador Pentium 233 MHz equipado com uma interface eletrônica (PCL-711S), através de programas em linguagem Lab-View 6.0. O módulo de detecção consistiu de uma cela de fluxo de polietileno (em espiral), um fotodiodo de silício (OSD-50E) e um dispositivo eletrônico (modelo FAC 500), para condicionamento e amplificação dos sinais, que foram acondicionados dentro de uma caixa plástica. O módulo de análise e detecção foi caracterizado e empregado inicialmente na determinação de H_2O_2 em amostras farmacêuticas, monitorando-se a quimiluminescência produzida na reação entre o luminol, H_2O_2 e hexacianoferrato(III) de potássio. A curva analítica apresentou uma linearidade entre $2,2 \times 10^{-6}$ a $2,1 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} e limite de detecção estimado em $1,8 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} . Nos procedimentos para a determinação de glicose em amostras alimentícias, farmacêuticas e bioquímicas, foi acoplado no percurso analítico, um reator enzimático contendo a enzima glicose oxidase imobilizada. O H_2O_2 gerado na reação enzimática foi monitorado pela quimiluminescência gerada na reação entre o luminol e hexacianoferrato(III) de potássio. Após a otimização do procedimento analítico, obteve-se uma faixa linear de resposta de 5,0 a 160,0 mg L^{-1} e uma frequência de amostragem de 160 determinações por hora. O procedimento analítico foi empregado com sucesso na determinação de glicose em mel, soro glicosado, suco de uva e suco de tomate. Para a determinação de glicose em plasma sanguíneo, o módulo de análise foi reconfigurado, a fim de se minimizar a manipulação da amostra. Os resultados obtidos na determinação de glicose em plasma sanguíneo, empregando o procedimento proposto, foram concordantes com o método comparativo a um nível de confiança de 95%. No procedimento analítico para a determinação de colesterol em ovos foi empregado um reator enzimático, no percurso analítico, contendo a enzima colesterol oxidase imobilizada, o H_2O_2 foi também monitorado pela reação quimiluminescente. A linearidade de resposta obtida, após a otimização do sistema em fluxo, foi de 250 a 2500 mg L^{-1} descrito pela equação: Intensidade (mV) = $43,0 + 0,325 \cdot [\text{colesterol}]$, $R = 0,999$, com consumo de 356 μg e 2,64 mg de luminol e hexacianoferrato (III) de potássio por determinação. O módulo de análise foi reconfigurado para a determinação de colesterol em plasma sanguíneo, apresentando resultados concordantes com o método comparativo. Foram realizados também estudos de extração e pré-purificação da enzima peroxidase, catalisador da reação quimiluminescente, entre o luminol e H_2O_2 .

Abstract

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF PROCEDURES ENVELOPEMENT OF CHEMILUMINESCENT REACTIONS IN FLOW FOR DETERMINATION OF ANALYTES OF INTEREST IN FOOD, PHARMACEUTICAL AND BIOCHEMISTRY

In this work, analytical flow procedures were developed using multicommutation concept and chemiluminescent detection for the determination of hydrogen peroxide, glucose and cholesterol in food, biochemistry and pharmaceutical samples. A personal computer Pentium 233 MHz equipped with PCL 711S interface was employed to control the flow manifold and data acquisition. The detection module consist of a flow-cell constructed with a coiled polyethylene tubing (0.8 mm i.d.), a silicon photodiode (OSD-50E) and an electronic device (model FAC 500) for signals conditioning and amplification, are devices were placed in a dark box. The manifold and detection module were characterized by hydrogen peroxide determination in pharmaceutical samples, monitoring the radiation produced in the chemiluminescent reaction between luminol, H₂O₂ and hexacyanoferrate(III). The analytical curve obtained was linear in the hydrogen peroxide concentration ranging from 2.2×10^{-6} to 2.1×10^{-4} mol L⁻¹ and the detection limit obtained was 1.8×10^{-6} mol L⁻¹. In the procedures for glucose determination in food, pharmaceutical and biochemical samples, a solid-phase reactor containing glucose oxidase immobilized in glass beads was employed. The hydrogen peroxide generated in this enzymatic reaction was monitored by chemiluminescent emission produced by the luminol/hexacyanoferrate(III) reaction. The proposed procedure showed linear response from 5.0 to 160.0 mg L⁻¹ and a sampling rate of 160 samples per hour was obtained. The analytical procedure was employed with success in the glucose determination in honey, glucose pharmaceutical formulation, grape and tomato juices. For glucose determination in blood serum, the manifold was reconfigured to minimize the sample manipulation. The results obtained in the glucose determination in serum using this proposed procedure are in close agreement with those obtained using the comparative procedure at a confidence level of 95%. In the proposed procedure for cholesterol determination in eggs a solid-phase reactor containing immobilized cholesterol oxidase was used, the hydrogen peroxide produced was monitored by the same chemiluminescent reaction. The linear range of analytical curve obtained in optimized procedure ranged from 250 to 2500 mg L⁻¹, and are described by the equation: Intensity (mV)= 43.0 + 0.325 x [cholesterol], r= 0.999, The luminol and hexacyanoferrate(III) consumption per determination were 356 µg and 2.64 mg, respectively. The manifold was reconfigured for cholesterol determination in serum. The results obtained were in agreement with those obtained using the comparative procedure. Extraction and pre-purification of enzyme peroxidase were carried out with the purpose of employing this enzyme as a catalyst in the chemiluminescent reaction between the luminol and hydrogen peroxide.

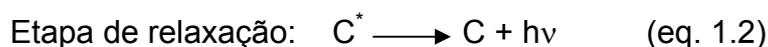
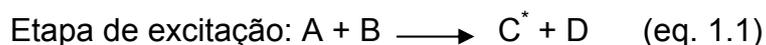
CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1. Luminescência

Luminescência é um termo empregado para descrever a emissão de luz, que ocorre quando uma molécula no estado excitado decai para o estado fundamental. Os vários tipos de luminescência caracterizam-se em função da fonte de energia empregada para se obter o estado excitado. Assim, quando a energia é fornecida na forma de radiação eletromagnética, tem-se a fotoluminescência (fluorescência ou fosforescência), na forma de calor (piroluminescência), impacto de elétrons (catodoluminescência) ou por cristalização (cristaloluminescência). Na quimiluminescência, a energia de excitação é produzida por uma reação química, sendo a emissão de luz observada geralmente na região do visível e infravermelho próximo.¹⁻²

Um esquema geral do processo de quimiluminescência é mostrado a seguir (equações 1.1 e 1.2):



A emissão obtida é idêntica aquela do espectro de fluorescência do composto C, no entanto, sem o emprego de radiação externa (fonte de excitação). Para que uma reação química produza luminescência, esta deverá satisfazer três condições, a saber: a) a energia necessária para ocorrer a reação química deve ser suficiente para produzir um estado eletronicamente excitado; b) o caminho reacional deve favorecer a formação do estado eletronicamente excitado e c) o produto deve ser luminescente ou transferir sua energia para uma molécula luminescente. As reações mais conhecidas são aquelas empregando o luminol, derivados de acridina (lucigerina) e outros compostos orgânicos (imidazóis, ésteres do ácido oxálico, oxalatos, etc).

Uma das reações mais conhecidas e exploradas em química analítica desde os anos 60¹ é a oxidação do luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona), por peróxido de hidrogênio em meio alcalino. O mecanismo desta reação foi pioneiramente estudado por Albrecht³, contudo,

este mecanismo bem como o de várias reações quimiluminescentes ainda não estão bem esclarecidos e continuam sendo objeto de pesquisas.¹⁻⁴

O interesse analítico da quimiluminescência surge dos excelentes limites de detecção que podem ser atingidos e da simplicidade da instrumentação necessária para o monitoramento da radiação⁴. A sensibilidade obtida nas técnicas analíticas quimiluminescentes está associada a vários fatores, principalmente pela ausência da irradiação prévia (fonte de radiação), eliminando problemas devido à dispersão de luz, excitação não seletiva e instabilidade e/ou ruído da fonte de radiação. A utilização de maiores diferenças de potencial nas fotomultiplicadoras (detectores usualmente utilizados), aumenta a razão sinal/ruído e a sensibilidade. Limites de detecção da ordem de fento moles não são incomuns com as técnicas analíticas quimiluminescentes. Em geral, a duração da radiação quimiluminescente varia entre 1-30 s, portanto a escolha do sistema de detecção bem como a velocidade com que este monitora e processa os sinais é de extrema importância para estabelecer os procedimentos analíticos. Além disso, mudanças de parâmetros como pH, mistura dos reagentes, temperatura, concentrações das espécies reacionais ou interferentes podem modificar totalmente o tempo de emissão da radiação, chegando até extingui-la.^{1-2,4-5}

As reações quimiluminescentes ocorrem tanto em fase sólida, líquida e gasosa. As principais reações em fase gasosa já estudadas são aquelas que ocorrem entre o ozônio e óxidos de nitrogênio, empregadas para a determinação de ozônio na atmosfera.⁶ As detecções de compostos contendo nitrogênio e enxofre também foram realizadas por cromatografia gasosa empregando reações quimiluminescentes. Porém, o meio que mostra maior potencial para aplicações analíticas é a fase líquida, tanto em meio aquosos como não aquoso.

1.1 Mecanismo da reação quimiluminescente do luminol

Vários estudos sobre o mecanismo de reação do luminol já foram publicados.^{1-3,8,9} Algumas propriedades termodinâmicas e cinéticas já foram apresentadas, além de possíveis caminhos mecanísticos para a reação, porém

ainda não há um mecanismo consensual abrangendo todos os intermediários e etapas da reação. Um esquema para o mecanismo da reação luminescente do luminol com peróxido de hidrogênio em meio alcalino na presença de um catalisador proposto por Albertin et al.⁹ é mostrado a seguir.

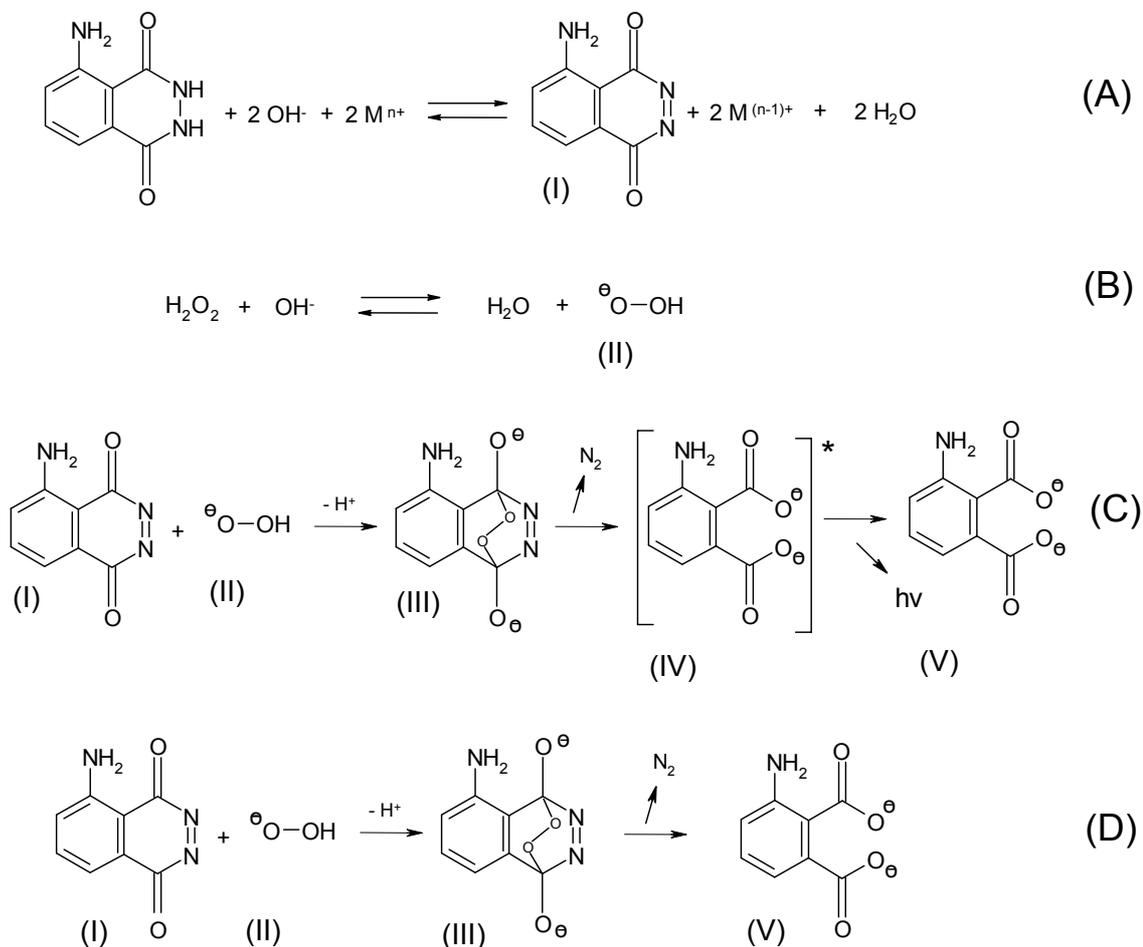


Figura 1.1- Esquema do mecanismo de reação do luminol com H_2O_2 em meio alcalino e na presença de um metal de transição M^{n+} como catalisador proposto por Albertin et al.⁹ Intermediários: (I) diazoquinona, (II) ânion de peróxido de hidrogênio, (III e IV) endo-peróxido e (V) 3-aminoftalato.

Na etapa de reação (A), pela ação do catalisador M^{n+} (íon de metal de transição), aparece o primeiro intermediário diazoquinona (I). Na etapa de reação (B) ocorre a formação do ânion do peróxido de hidrogênio (II) em meio

alcalino. Duas possíveis rotas de reação para os intermediários (I) e (II) são apresentadas nas etapas (C) e (D).

A etapa (C) mostra a reação entre (I) diazoquinona e (II) ânion do peróxido de hidrogênio, gerando o 3-aminofalato (intermediário (V)) e (hv) quimiluminescência. Na etapa (D) há reação entre os intermediários (I) e (II) produzindo apenas o 3-aminofalato e N₂, sem produção de quimiluminescência.

Do ponto de vista analítico, provavelmente as etapas (A) e (B) são as mais importantes, além da etapa (C) (geração da luminescência). Nestas etapas se determinam as concentrações das espécies que formam o intermediário responsável pela luminescência na etapa (C) e serão responsáveis pela duração e intensidade de emissão.^{9,10}

Porém, não existem estudos conclusivos sobre a presença de metais de transição na reação quimiluminescente, e o intermediário endo peróxido (IV) ainda não foi detectado (presume-se que este intermediário se decompõe muito rapidamente), o que explica o fato de ainda não ter sido detectado.

1.2 Enzimas

As enzimas são moléculas orgânicas presentes nas células de organismos vivos, com a função específica de catalisar reações químicas. Como catalisadores, as enzimas aumentam a velocidade da reação até atingir o equilíbrio. Nos estágios intermediários da reação, a enzima liga-se à molécula que está sendo transformada e, a medida que o produto vai sendo liberado, a enzima é regenerada na sua forma original. Os catalisadores biológicos possuem duas características importantes, a enzima não é modificada por participar da reação e a constante de equilíbrio da reação não se altera com o emprego do biocatalisador, simplesmente, verifica-se um aumento na velocidade na qual a reação alcança o equilíbrio. Os biocatalisadores são constituídos principalmente por cadeias polipeptídicas. A parte protéica da enzima, sem cofatores ou grupos prostéticos, é denominada apoenzima, e não apresenta atividade catalítica. Os cofatores são pequenas moléculas orgânicas como as coenzimas FAD e NAD ou são íons como Fe(II), Mn(II), Cu(II), etc, os quais ligam-se fracamente a apoenzima e estão envolvidos diretamente na atividade catalítica. O grupo

prostético, ao contrário, se liga fortemente à apoenzima. A associação do cofator ou grupo prostético à apoenzima forma a holoenzima que é a enzima ativa.^{11,12}

A molécula sobre a qual a enzima atua para formar o produto é chamado substrato. As enzimas apresentam como característica singular a seletividade. A seletividade, deve-se a uma região particular da superfície enzimática denominada sítio de ligação do substrato, que é um arranjo particular de grupos químicos ao qual o substrato se liga. No sítio de ligação do substrato, pode estar integrado o sítio ativo (responsável pela atividade catalítica). Algumas enzimas mostram seletividade absoluta para o substrato, enquanto outras apresentam uma seletividade mais ampla e irão aceitar vários análogos diferentes de uma família de substrato. Vários modelos têm sido propostos para explicar a interação enzima-substrato. A primeira proposta, elaborada em 1890, por Fisher, foi o modelo “chave-fechadura”, no qual considera-se a existência de uma impressão negativa do substrato sobre a superfície da enzima. O substrato encaixa-se nesse sítio de ligação como uma chave e uma fechadura. Nesse modelo, o sítio ativo apresenta características estruturais rígidas que são complementares aquelas de cada substrato, porém não prevê os efeitos de interações alostéricas. Outro modelo, sugerido por Koshland em 1968, conhecido como ajuste induzido, sugere um ajuste na conformação da superfície da enzima com a aproximação do substrato, formando um sítio de ligação. Neste modelo, os sítios ativos são flexíveis, apresentando uma estrutura complementar àquela do substrato somente quando estiver ligada à enzima. As reações catalisadas por enzimas ocorrem em velocidades que são, 10^9 a 10^{12} vezes mais rápidas que as reações correspondentes não catalisadas.^{11,12}

As aplicações de enzimas são dependentes de conhecimentos básicos e específicos sobre o mecanismo de catálise e cinética enzimática. Há excelentes livros especializados nessas áreas para elucidar e ampliar os conhecimentos sobre a ação das enzimas.

A aplicação analítica de enzimas imobilizadas vem sendo utilizada preferencialmente, no lugar da enzima em solução. A imobilização de enzimas em matrizes inertes aparece como uma boa alternativa para manter a atividade catalítica e a estabilidade das enzimas. Além disso, a enzima imobilizada pode ser reutilizada, os procedimentos que as contêm podem ser operados

continuamente e controlados eficientemente, a enzima imobilizada torna-se menos susceptível à variação de temperatura, pH e à ação de ativadores e inibidores que atuam na enzima em solução. Os métodos mais utilizados de imobilização de enzimas são os de ligação química covalente, ligação química covalente cruzada, oclusão em gel, adsorção física, microencapsulação e polimerização eletroquímica.^{13,14} Enzimas imobilizadas, vem sendo amplamente empregadas em química analítica, na construção de biossensores, e de reatores enzimáticos que são acoplados em sistema cromatográficos e em procedimentos de análise em fluxo.^{15,16}

1.3 Sistemas de análises em fluxo e multicomutação

Os sistemas de análise por injeção em fluxo tem como objetivo a mecanização da análise química, através da introdução da solução da amostra em um fluido transportador, que conduz a amostra em direção à cela de detecção, sendo possível, ao longo do percurso analítico, receber reagentes e passar por etapas de processamentos, como: separações, diluições, extração líquido-líquido, pré-concentração etc.^{17,18}

Desde a proposta do conceito de “Flow Injection Analysis” por RUZICKA e HANSEN,¹⁷ vários procedimentos de automação/mechanização de procedimentos analíticos foram desenvolvidos. A fácil assimilação desta técnica pela comunidade científica se deve à simplicidade da instrumentação, facilidade operacional e da implementação dos módulos de análise, utilizando em muitos casos, instrumentação de baixo custo.

Segundo a IUPAC¹⁹, União Internacional de Química Pura e Aplicada, a automação é definida, como o uso combinado de dispositivos mecânicos e instrumentais para substituir, refinar, ampliar ou suplementar o esforço e a inteligência humana, na execução de um dado processo, no qual pelo menos uma das operações é controlada sem a intervenção humana, por um sistema de realimentação (*feedback*). A definição para mecanização, também segundo a IUPAC, refere-se ao uso de dispositivos para substituir, refinar, ampliar ou suplementar o esforço humano, diferenciando da automação por não ser efetuada a realimentação em nenhuma parte do processo.

Com a disseminação dos procedimentos em fluxo e a necessidade da adaptação destes procedimentos nas mais variadas etapas que envolvem as análises químicas, além da disponibilização de novos dispositivos eletrônicos e de computadores nos laboratórios de pesquisa e de rotina, outros conceitos de automação analítica foram propostas como: sistema de análise em fluxo monossegmentado (MSFA),²⁰ análise por injeção sequencial (SIA)²¹ e a multicomutação.²²

Nos procedimentos analíticos empregando o conceito de multicomutação, as soluções reagentes e/ou amostras são introduzidas no percurso analítico empregando dispositivos de comutação discreta, na maioria dos trabalhos, válvulas solenóides de 3 vias, que são gerenciadas por um micro-computador. Assim, é possível interagir com o módulo de análise, sem a necessidade de modificar a estrutura física do módulo, alterando os parâmetros do *software* de controle.^{22,23}

Nos trabalhos de Reis et al^{22,24} são descritos os primeiros conceitos envolvidos e a instrumentação necessária para a implementação de procedimentos analíticos em fluxo por multicomutação. Além de vários trabalhos, já estão disponibilizados na literatura duas revisões, no qual são destacadas as potencialidades e as tendências da introdução desta estratégia na implementação da automação de procedimentos analíticos.^{25,26}

Nesta tese, são descritos o desenvolvimento de procedimento analíticos em fluxo, empregando o conceito de multicomutação, no qual enzimas imobilizadas são acopladas no percurso analítico, para a determinação de glicose e colesterol por quimiluminescência em matrizes farmacêuticas, alimentícias e bioquímicas.

CAPÍTULO 2

ESTUDOS PRELIMINARES DA REAÇÃO QUIMILUMINESCENTE EMPREGANDO O MÓDULO DE ANÁLISE E DETECÇÃO DESENVOLVIDOS

2. Apresentação

Neste Capítulo serão apresentados os estudos preliminares realizados sobre a reação quimiluminescente do luminol no sistema em fluxo, empregando um fotodiodo de silício como detector.

Inicialmente será apresentada uma abordagem sobre os aspectos relacionados à aplicação analítica da quimiluminescência, e, alguns aspectos relevantes destas aplicações em sistemas de análise em fluxo. Na seqüência serão apresentados os resultados obtidos, da aplicação analítica na determinação de peróxido de hidrogênio empregando um sistema de análise em fluxo.

2.1 Introdução

A quimiluminescência pode ser definida como a emissão de radiação eletromagnética (nas regiões do ultravioleta, visível ou infravermelho), resultante de uma reação química, quando um dos produtos ou intermediário da reação, ao retornar do estado eletronicamente excitado para o estado fundamental, emite energia na forma de luz¹⁻³. Em procedimentos analíticos empregando reações quimiluminescentes, a intensidade da radiação varia em função do tempo e do rendimento quântico. Os parâmetros que governam a intensidade da quimiluminescência em função do tempo são retratados mais facilmente, avaliando-se a equação 2.1.

$$I_{CL} = \Phi_{CL}(dP/dt) = \Phi_{EX}\Phi_{EM}(dP/dt) \quad \text{eq. 2.1}$$

onde:

I_{CL} = é a intensidade da quimiluminescência (número de fótons emitidos por segundo);

dP/dt = é a velocidade da reação química (número de moléculas que reagem por unidade de tempo (s));

Φ_{CL} = é o rendimento quântico quimiluminescente (número de fótons emitidos por molécula excitada);

Φ_{EX} = estado de excitação quântica (número de estados excitados formado por molécula) e,

Φ_{EM} = estado de emissão quântica (número de fótons emitidos pelo estado eletronicamente excitado).

Assim, em procedimentos analíticos, a concentração do analito de interesse pode ser relacionada com a intensidade da radiação emitida, ou pela variação da velocidade da reação quimiluminescente.^{1,6, 27,28} A quantificação de outras espécies, como metais (em geral, catalisadores), oxidantes e redutores que participam da reação ou determinam a velocidade da reação, mas que não são diretamente responsáveis pela luminescência, é constantemente utilizada.²⁸ Em geral, é necessário um sistema para a mistura dos reagentes e detecção (que na maioria das vezes é uma fotomultiplicadora). Portanto, a obtenção de elevada sensibilidade com uma simples instrumentação permite a aplicação em química analítica. Geralmente, os procedimentos quimiluminescentes são implementados em sistemas de análises em fluxo, no qual, dentre outras vantagens, figura a reprodutibilidade dos sinais obtidos. Entretanto, as reações quimiluminescentes apresentam diversas variáveis experimentais que afetam a emissão luminescente,²⁹ tais como : (a) volume da amostra: a emissão de luz é diretamente proporcional ao volume da amostra quando a concentração e a razão dos reagentes são constantes. As constantes físicas da instrumentação utilizada irão influenciar nesta variável; (b) velocidade da reação: as cinéticas das reações quimiluminescentes podem ser diferentes dependendo do tipo de molécula emissora, do analito e das condições na qual estas reações ocorrem. Algumas reações são lentas e é necessário conhecer o tempo de incubação ideal para medir a intensidade luminescente. Outras reações são extremamente rápidas, emitindo, muitas vezes; (c) concentração dos reagentes: a concentração do material luminescente afeta diretamente a intensidade da emissão de luz produzida na reação quimiluminescente. A molécula emissora e/ou o analito podem ser o reagente limitante, e a emissão luminescente depende, portanto deles. Para maximizar a eficiência da emissão luminescente, o reagente (molécula emissora de luz) deve estar mais concentrado ou em maior volume que o analito a

ser determinado; (d) injeção do reagente e mistura dos componentes: Devem ser extremamente reprodutíveis; (e) tamanho e material da cela de fluxo ou câmaras de reação: os materiais utilizados na construção da cela de fluxo devem ser transparentes a luz no comprimento de onda da reação quimiluminescente utilizada (vidro, acrílico, quartzo ou tubo de polietileno). O tamanho das celas de fluxo deve ser tal que permita o máximo de emissão luminescente com o mínimo de quantidade de amostra utilizada; (f) temperatura: a temperatura pode afetar a velocidade e a intensidade da emissão de luz em reações quimiluminescentes. Algumas reações têm um alto coeficiente de temperatura (razão de quantidade de luz emitida em função da temperatura), sendo extremamente dependentes de flutuações de temperatura; (g) luz externa: as reações quimiluminescentes devem ocorrer em um ambiente livre da interferência de luz externa para evitar o deslocamento da linha de base; (h) vazão do sistema FIA: a vazão total deve ser adequada à cinética da reação quimiluminescente.

Apesar destas variáveis experimentais e do mecanismo (no caso do luminol) ainda não ter sido totalmente elucidado, as reações quimiluminescentes apresentam grande potencialidade analítica e esse comportamento vem sendo observado pelo número de trabalhos analíticos publicados nos últimos anos.^{4, 27-30}

As aplicações analíticas quimiluminescentes, empregando luminol como reagente, podem ser classificadas em diretas ou indiretas. Nas aplicações diretas, em geral, o analito de interesse catalisa a reação (muito empregado para detecção de metais de transição) ou a sua presença promove a supressão da emissão da radiação quimiluminescente (comum a muitos compostos orgânicos).³⁰ Nas aplicações indiretas, destaca-se a determinação de substâncias, geradas em reações preliminares e, subseqüentemente determinadas pela reação quimiluminescente. Um exemplo clássico é a determinação do peróxido de hidrogênio, proveniente da oxidação do analito de interesse por enzimas, que subseqüentemente participa da reação quimiluminescente. Neste caso, soma-se a seletividade do procedimento às propriedades dos procedimentos quimiluminescente em fluxo. Outro exemplo indireto é a prévia separação das espécies de interesse na amostra, empregando técnicas cromatográficas e eletroforéticas¹⁰. Os procedimentos em fluxo com detecção por quimiluminescência são aplicados nas mais diferentes amostras, e são descritos

em revisões na literatura.^{27,28} A Figura 2.1 apresenta a distribuição percentual dos procedimentos analíticos em fluxo, empregando-se detecção quimiluminescente, publicados nos últimos cinco anos (2000 a 2005) em diferentes amostras.

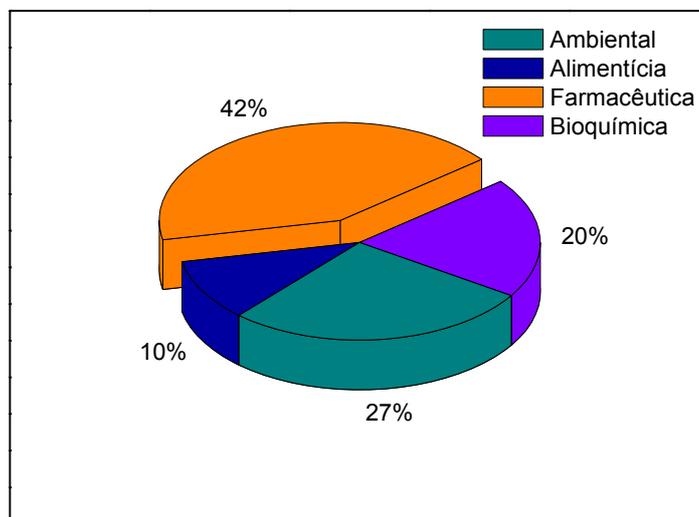


Figura 2.1 – Distribuição percentual dos procedimentos analíticos em fluxo com detecção quimiluminescente para diferentes amostras (2000–2005). Fonte: www.webofscience.com. Expressões de busca: flow injection analysis and chemiluminescence or flow analysis and chemiluminescence or multicommutation and chemiluminescence.

Um total de 217 procedimentos analíticos em fluxo com detecção quimiluminescente foram distribuídos em quatro grandes áreas de aplicação como: Ambiental, Alimentícia, Farmacêutica e Bioquímica. Em dezessete procedimentos, os analitos de interesse foram quantificados em mais que uma área de aplicação, sendo que na maioria, doze, o mesmo procedimento foi empregado para quantificações em amostras farmacêuticas e bioquímicas. Onze procedimentos analíticos foram realizados empregando-se o conceito de multicomutação, mais especificamente o uso de válvulas solenóides, como dispositivos discretos, na construção do módulo de análise.

Na maioria dos procedimentos em fluxo que compõe a Figura 2.1, o reagente luminescente mais popularmente empregado foi o luminol (73%), mas

verificam-se também vários trabalhos empregando os oxidantes permanganato de potássio e Ce(IV). Há trabalhos descrevendo o emprego dos reagentes 1,10-fenantrolina, ácido gálico/pirogálico, lucigenina e peróxido-oxalato. Recentemente, lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão tem sido implementada em procedimentos em fluxo, para a modificação da estrutura de uma substância alvo para posterior detecção com reagentes quimiluminescentes.

Neste período, procedimentos em fluxo também foram empregados nos estudos de parâmetros cinéticos de reações quimiluminescentes e de novas substâncias e/ou reações quimiluminescentes, totalizando-se 31 trabalhos.

A maioria dos trabalhos de quantificação realizada em amostras farmacêutica é relacionada à disponibilidade de um grande número de analitos de natureza orgânica nestas amostras. Já nas amostras ambientais, as quantificações de espécies com estados de oxidação distintos (especificação) e em pequenas concentrações são apresentadas como tendências para o desenvolvimento dos procedimentos. Os procedimentos analíticos quimiluminescentes indiretos, nas áreas bioquímica e alimentícia, se caracterizam na maioria pelo emprego de reatores enzimáticos que geram peróxido de hidrogênio que é posteriormente quantificado via reação quimiluminescente.

2.2 Parte Experimental

2.2.1 Descrição geral do sistema

O módulo de análise foi construído empregando-se válvulas solenóides de três vias (NRResearch 161T031), tubos de polietileno com 0,8 mm de diâmetro interno e conectores de acrílico (ponto de confluência). Uma interface de potência para o acionamento das válvulas solenóides também foi construída.²³ O gerenciamento das válvulas solenóides foi realizado por um microcomputador, Pentium 233 MHz, equipado com uma interface eletrônica (Advantec Corp., PCL 711S). A propulsão das soluções no sistema em fluxo foi realizada por uma bomba peristáltica (Ismatec IPC-8), equipada com tubos de Tygon. As medidas da quimiluminescência foram realizadas empregando-se um fotodiodo de silício com uma área sensível à radiação de 50 mm², adaptando-se uma cela de fluxo de

polietileno com ca. 500 μ L. Para o condicionamento e amplificação da corrente gerada pelo fotodiodo de silício, foi empregado um dispositivo eletrônico (Amplificador) FAC modelo 500X. A montagem do módulo de detecção é descrita com mais detalhes no item 2.2.2. A linguagem de programação utilizada para o gerenciamento do módulo de análise foi Lab-View 6.0, e a interface com o usuário, *formulário*, é apresentada na Figura 2.2

Esta interface permite a visualização dos sinais transientes provenientes do sistema de detecção, o controle do acionamento das válvulas solenóides e da bomba peristáltica. Empregando um arquivo de comandos, montado em forma de matriz, é possível programar vários eventos como acionamento das válvulas, direção e velocidade da bomba, número de replicatas, entre outros.

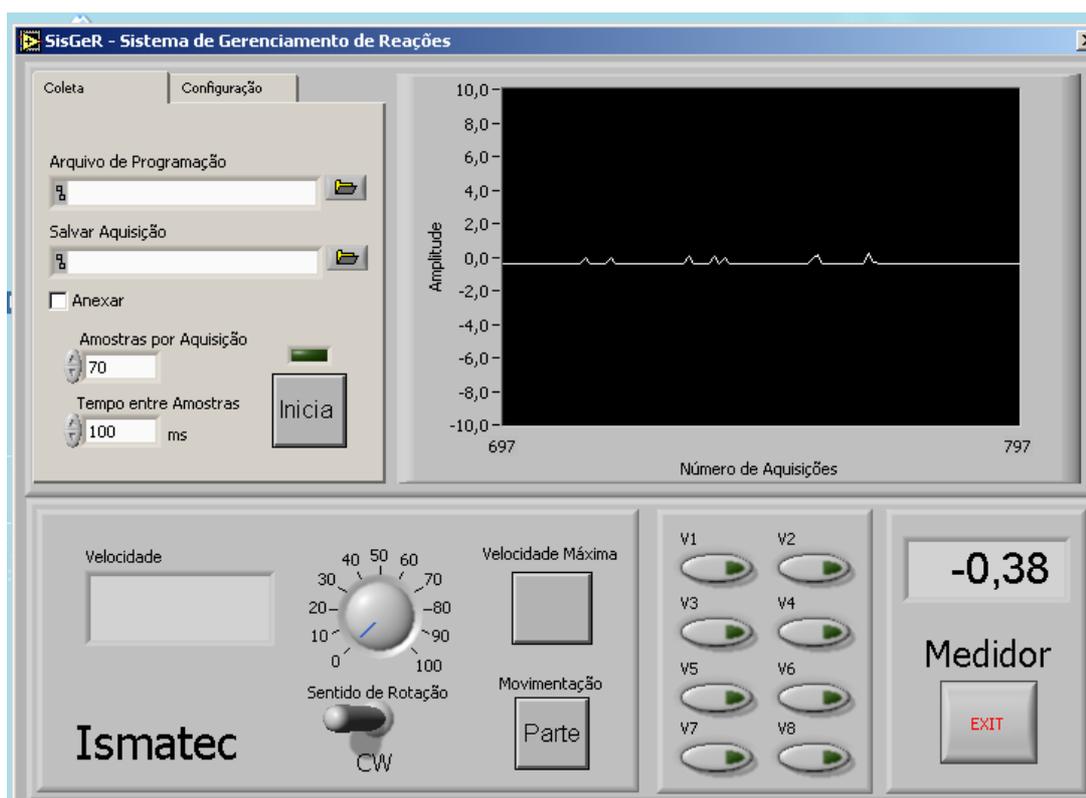


Figura 2.2 - Formulário (tela) empregada para interface com o usuário.

Após a aquisição de cada sinal transiente, os dados referentes às medidas da intensidade luminescente (mV) são salvos no arquivo previamente definido, em colunas independentes e o sinal transiente é mostrado no espaço

reservado no formulário. Assim, os valores de intensidade de luminescência em mV, são associados aos valores de tempo nos quais a aquisição foi efetuada, podendo-se trabalhar esses dados em programas gráficos como o Origin e Excel.

2.2.2 – Módulo de detecção

As celas de fluxo foram construídas, empregando tubos de polietileno de 0,8 mm de d.i. Diferentes comprimentos dos tubos (50 a 150 cm) foram enrolados em espiral dentro de uma tampa plástica de 30 mm de diâmetro, da maneira ilustrada na Figura 2.3.

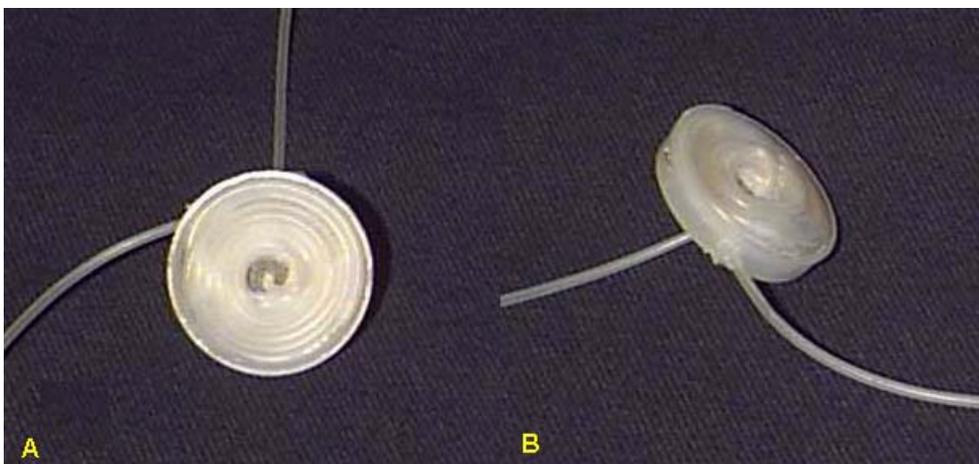


Figura 2.3- Fotos da cela de fluxo (A e B) construídas, empregando tubo de polietileno (diâmetro interno de 0,8 mm) enrolado em espiral.

As medidas da radiação quimiluminescente foram realizadas empregando-se um fotodiodo de silício com área sensível de 50 mm² (OSD50-E, RS 846-711). Construiu-se, com o auxílio de espelhos de lâmpadas dicróicas, uma câmara refletora, na qual de um lado foi afixado o detector e de outro a cela em espiral de polietileno (100 cm).

Um dispositivo eletrônico, modelo FAC 500X, foi empregado para o condicionamento e amplificação dos sinais gerados pelo fotodiodo. Este dispositivo foi colocado dentro de uma caixa plástica de 20 x 20 cm, na qual do lado de fora foi acoplada a câmara de detecção. Na Figura 2.4 são apresentadas fotos do módulo de detecção construído.



Figura 2.4 – Fotos do módulo de detecção construído, empregando um fotodiodo de silício e a cela de medida de tubo de polietileno em espiral, para o monitoramento da radiação quimiluminescente.

2.2.3 – Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas empregando-se água destilada e desionizada e reagentes com grau de pureza analítico.

Soluções de tampão carbonato de potássio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo-se $27,6 \text{ g}$ de K_2CO_3 em 500 mL de água, ajustando-se o pH para, $9,1$, $10,1$ e $11,0$ com solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução estoque de luminol $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se $318,0 \text{ mg}$ de 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona (Sigma) em 200 mL de solução de carbonato de potássio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ (pH $9,1$ a $11,0$). A solução foi preparada 3 dias antes do uso e armazenada em frasco âmbar mantida sob refrigeração. Soluções de trabalho em concentrações variando de $1,0$ a $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de luminol foram preparadas por diluições, em carbonato, da solução estoque.

A solução estoque de hexacianoferrato (III) de potássio $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se $4,125 \text{ g}$ do sal (Reagen) em 500 mL de água

desionizada. Soluções de trabalho em concentrações variando de 5,0 a 50,0 mmol L⁻¹ de hexacianoferrato(III) de potássio foram preparadas por diluições da solução estoque.

Solução de permanganato de potássio 0,02 mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 0,7884g de KMnO₄ em 250 mL de água. A padronização desta solução foi realizada com oxalato de sódio como padrão primário.

Soluções estoque de peróxido de hidrogênio 1,0 mmol L⁻¹ foram preparadas diariamente a partir de uma solução 30% (m/m) e padronizadas volumetricamente com permanganato de potássio. Soluções de referência de peróxido de hidrogênio em concentrações variando de 2,5 a 500,0 μmol L⁻¹ foram preparadas por diluições da solução estoque.

As soluções dos cátions Ni²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺, nas concentrações de 25,0 mmol L⁻¹, foram preparadas a partir dos sais de acetato de níquel, sulfato de manganês, sulfato de cobalto, sulfato de cobre e sulfato de zinco em água desionizada.

A obtenção da enzima peroxidase empregada no estudo como catalisador da reação quimilumincente esta descrita em mais detalhe no apêndice.

2.2.4. Procedimento Experimental

2.2.4.1 Reação quimilumincente

A radiação quimilumincente é decorrente da reação de oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogênio, em meio alcalino na presença do catalisador hexacianoferrato(III) (Fig. 2.5), sendo a radiação produzida (hν) proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio na solução.

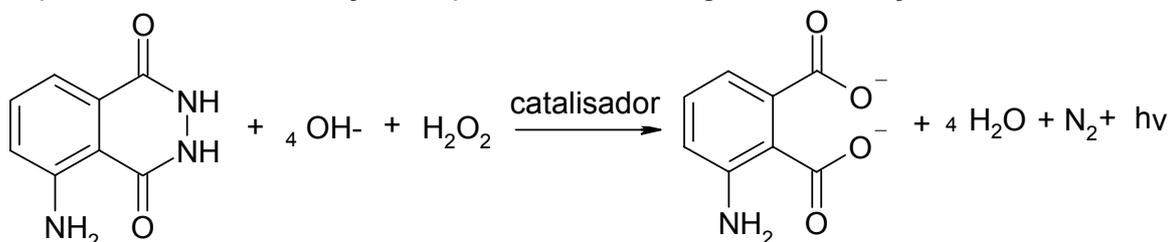


Figura 2.5 – Esquema de reação entre luminol e o H₂O₂ em meio alcalino na presença de um catalisador para geração da quimiluminescência.

2.2.4.2 Diagrama de fluxos e procedimento

O diagrama de fluxo do módulo de análise inicialmente construído para os estudos da reação quimiluminescente (luminol- H_2O_2 -catalisador) é apresentado na Figura 2.6. O módulo é constituído por 4 válvulas solenóides (V_1 , V_2 , V_3 e V_4), que gerenciam a inserção das soluções reagentes e carregador no percurso analítico e pelo detector luminescente (L) contendo uma cela de polietileno em espiral de 100 cm. A válvula solenóide é representada por um círculo com duas linhas que indicam os possíveis percursos das soluções e/ou carregador. A linha cheia representa a passagem das soluções para o percurso analítico, enquanto a linha tracejada indica que as soluções estão circulando de volta para seu reservatório.

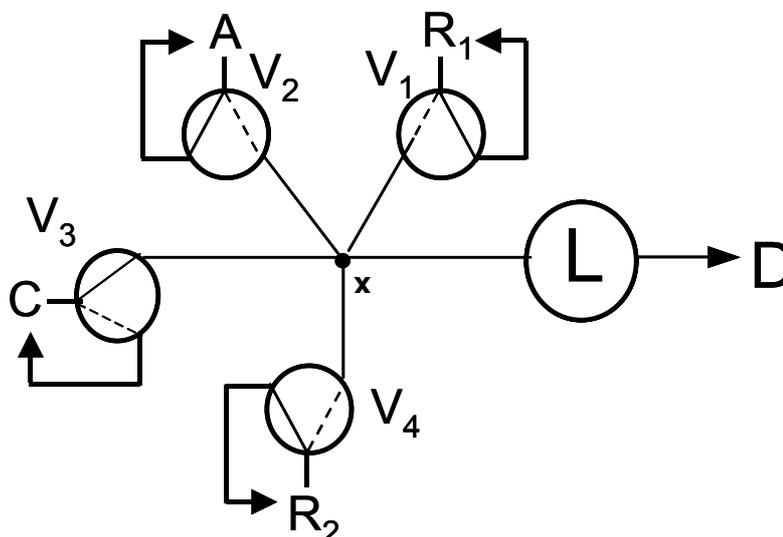


Figura 2.6 – Diagrama de fluxos do sistema empregado para estudo da reação quimiluminescente e determinação de peróxido de hidrogênio. C- carregador; A – soluções padrões de peróxido e/ou amostras; R_1 – solução de luminol; R_2 – solução de ferricianeto de potássio; V_1 – V_4 – válvulas solenóides de 3 vias ; L – luminômetro construído com fotodiodo de silício contendo uma cela em espiral de polietileno de 100 cm; D – descarte; x – ponto de confluência, a 10 cm do luminômetro.

No módulo de análise representado na Fig. 2.6 a solução carregadora (H_2O) flui pelo percurso analítico através (V_3), enquanto as demais soluções permanecem reciclando. A adição das soluções reagentes e/ou

amostras e efetuada pelo acionamento das válvulas solenóides (V_1 - Luminol, V_2 - H_2O_2 e V_4 - $[Fe(CN)_6]^{3-}$). Quando ocorre a introdução dos reagentes no percurso analítico, o fluxo do carregador (H_2O) é direcionado para o reciclo.

Este módulo de análise foi inicialmente proposto para avaliar a estabilidade da solução de luminol, otimizar as melhores condições reacionais da reação quimiluminescente (luminol- H_2O_2 -catalisador), determinar as características analíticas e para quantificação da concentração de peróxido de hidrogênio em amostras reais, empregando-se o detector construído com o fotodiodo de silício e a cela de fluxo de polietileno.

Após a otimização dos diferentes parâmetros químicos, concentração de luminol e ferricianeto de potássio, e físicos, volume dos reagentes, além do estudo preliminar da reação quimiluminescente, a determinação de peróxido de hidrogênio foi efetuada de acordo com a seqüência de acionamento das válvulas definidas na Tabela 2.1.

TABELA 2.1 – Esquema de acionamento das válvulas solenóides para a determinação de peróxido de hidrogênio, diagrama de fluxo da Figura 2.6.

Etapas	V1	V2	V3	V4	Bomba peristáltica (%)rotação	direção	Tempo (s)
1	0	0	0	0	15	ccw	5
2	1	1	1	1	15	ccw	4
3	0	0	0	0	15	ccw	10
* repetições (2-3)							
4	0	0	0	0	0	ccw	0

0 = válvula solenóide desligada

1= válvula solenóide acionada

ccw : direção de rotação da bomba peristáltica, sentido horário

* repetição em triplicata das etapas 2-3

Inicialmente flui pelo sistema apenas o carregador (água), etapa 1, durante 5 segundos. Na etapa 2, são acionadas as válvulas ($V_1 - V_4$), o carregador é desviado do percurso analítico (V_3) e são inseridos pelo ponto de confluência x, as soluções de luminol, peróxido e ferricianeto de potássio, durante 4 segundos, (V_1 , V_2 e V_4). As válvulas são desligadas e o carregador flui pelo

sistema novamente durante 10 segundos. As etapas 2 e 3 são repetidas na seqüência, em triplicata. No final, etapa 4, todas as válvulas estão desligadas, a porcentagem (%) zero (0) de rotação indica a parada da bomba peristáltica e, o tempo 0 finaliza a rotina do programa. No início da etapa 1, começa a ser realizada a aquisição de dados do luminômetro, e os resultados expressos em tempo *versus* intensidade de luminescência (mV) são gravados em arquivos pré-estabelecidos.

2.3- Resultados e Discussão

2.3.1- Avaliação da estabilidade da solução de luminol

Estudos prévios realizados mostraram uma variação do sinal analítico da reação luminol-H₂O₂-Fe(CN)₆³⁻ em função do tempo de uso dos reagentes. Na literatura, existem diferentes procedimentos descritos de preparo, em especial, da solução de luminol^{31,32}, mas estes praticamente não fazem menção a estabilidade desta solução. Sendo assim, duas estratégias de uso da solução de luminol foram avaliadas.

As soluções de luminol foram preparadas da mesma forma (vide parte experimental), entretanto foram realizadas medidas com uma solução de luminol 3,0 mmol L⁻¹ recém preparada, e outra solução de luminol 3,0 mmol L⁻¹ que tinha sido preparada à três dias e mantida em geladeira a 4 °C. As medidas de quimiluminescência em triplicata foram realizadas com ambas as soluções empregando-se o módulo de análise apresentado na Figura 2.6 em diferentes intervalos de tempo (1 a 7 horas).

Os estudos realizados com a solução de luminol recém preparada, apresentaram maior sinal analítico, quando comparado com a solução de luminol preparada há 3 dias, nas primeiras horas de utilização deste reagente, e, observou-se um decréscimo do sinal analítico ao longo do dia. Após 7 horas de uso, o sinal analítico era de aproximadamente 50% daquele obtido inicialmente. A repetibilidade dos sinais analíticos, medidas em triplicata, realizadas nos diferentes intervalos de tempo, apresentou uma variação em torno de 4,4%. O perfil obtido das medidas quimiluminescentes, empregando a solução de luminol preparada 3 dias antes, mostrou-se praticamente constante ao longo das medidas realizadas no dia, indicando que existe a necessidade da preparação prévia (3 dias antes do uso) da solução de luminol, a ser empregado em procedimentos analíticos. As repetibilidades da resposta obtidas com esta solução apresentaram

uma variação de 2,1%. A Figura 2.7 apresenta os resultados obtidos nos estudos da avaliação das soluções de luminol.

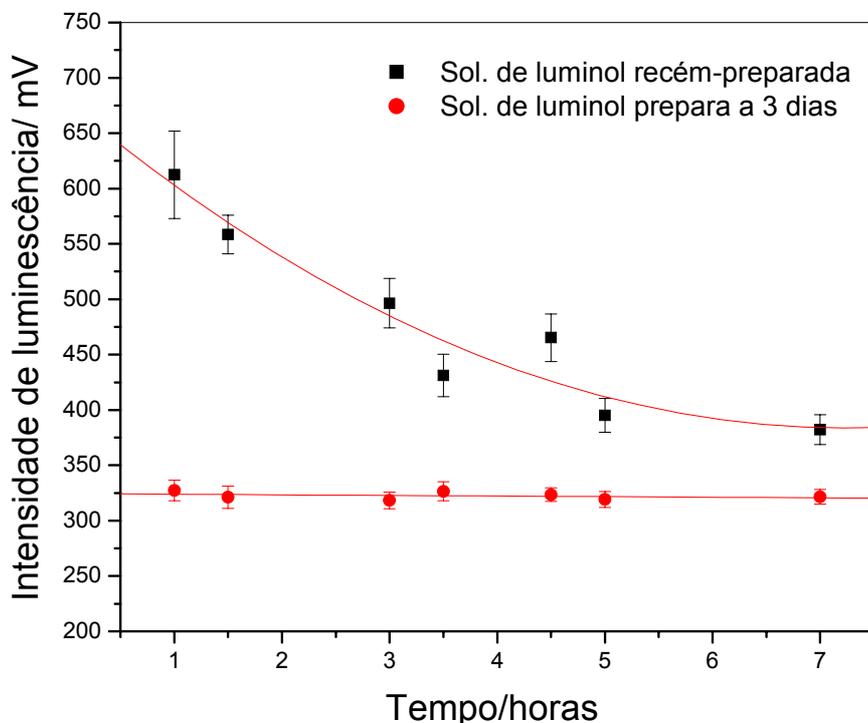


Figura 2.7 – Monitoramento do sinal analítico da reação quimiluminescente, empregando a solução de luminol $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$: ■ preparado há 3 dias; ● recém preparada, empregando o sistema em fluxo (Fig. 2.6) nas seguintes condições: R_1 = soluções de luminol $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$, R_2 = solução de peróxido de hidrogênio $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; R_3 = solução de ferricianeto de potássio $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$, C = água; vazão das soluções $3,0 \text{ mL min}^{-1}$; tempo de acionamento das válvulas V_1 - V_4 por determinação = $4,0 \text{ s}$.

Avaliou-se também a estabilidade da solução de luminol $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (preparado há três dias antes do uso) no intervalo de 20 dias. Os sinais analíticos observados após 15 e 20 dias foram de 91% e 83% daquele inicial, respectivamente. Alguns autores,³³⁻³⁵ associam a variação da resposta analítica à possível absorção de CO_2 pela solução de luminol. A presença de CO_2 causaria um favorecimento da formação de estados intermediários excitados do luminol, que ao retornarem para o estado fundamental emitem luz. Já os resultados obtidos no presente estudo revelaram um decréscimo do sinal analítico em função do tempo.

2.3.2 – Avaliação da cela de reação e medida construída em polietileno

Uma das principais dificuldades relacionadas à implementação de procedimentos baseados em medidas por quimiluminescência é maximizar a quantidade de radiação detectada, uma vez que a emissão ocorre em todas as direções.³⁶ Desta forma, diversas configurações de celas têm sido propostas,³⁷⁻⁴³ sendo usual o emprego de celas em espiral, posicionadas em frente ao detector (usualmente uma fotomultiplicadora). Essas celas são construídas em vidro ou quartzo e não são facilmente acessíveis. O tubo de polietileno, material empregado na construção da cela, é satisfatoriamente transparente à radiação emitida pela oxidação do luminol (Figura 2.8) e pode ser adquirido a baixo custo (US\$ 0,40/metro) no mercado nacional. A cela em espiral foi adaptada em frente a um fotodiodo de silício e permite a implementação de procedimentos baseados em quimiluminescência a custo relativamente baixo.

Segundo STIEG e NIEMAM,³⁶ a magnitude da luminescência detectada é uma fração média da radiação gerada na reação (uma parte dos fótons não atinge diretamente o fotodetector, mas sim as paredes da cela de fluxo). Neste contexto, para maximizar a incidência da radiação no fotodetector, espelhos de lâmpadas dicróicas (Figura 2.4) foram utilizados, a fim de refletir a radiação dispersa ao fotodiodo. Na Tabela 2.2, são apresentados os sinais analíticos obtidos em função do comprimento do tubo de polietileno empregado na construção da cela de medida.

TABELA 2.2 - Efeito do comprimento da cela sobre o sinal analítico empregando, R₁ = soluções de luminol 3,0 mmol L⁻¹, R₂ = solução de peróxido de hidrogênio 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹; R₃ = solução de ferricianeto de potássio 20,0 mmol L⁻¹, C = água; vazão das soluções 3,0 mL min⁻¹; tempo de acionamento das válvulas V₁-V₄ por determinação = 4,0 s.

Comprimento da cela (cm)	Magnitude do sinal (mV)	CV/(%)
50	78 ± 2	2,6
100	323 ± 8	2,5
150	242 ± 3	1,3

n=3



Figura 2.8- Fotografia mostrando emissão de luz da cela preenchida pelos reagentes empregados na determinação de H_2O_2 por quimiluminescência

Os melhores resultados foram obtidos para a cela construída com 100 cm de tubo. Os resultados obtidos para comprimentos maiores de tubo (150 cm) apresentaram menores resultados, quando comparado com a cela contendo 100 cm. Nesta cela o número de hélices na espiral era maior (o diâmetro é mantido constante, 30 mm, em todas as celas) e a radiação emitida nas hélices internas não alcançava o detector, devido provavelmente a auto-absorção da radiação pela solução das espiras mais externas associado ao rápido tempo de emissão da radiação. Para comprimentos menores, uma fração representativa da radiação era emitida após a cela de medida.

Empregando esta configuração de cela de fluxo e detecção, um trabalho⁴⁴ na área de educação, foi proposto, no qual também foram abordados conceitos de análise por injeção em fluxo e de biocatalisadores. A medida da radiação quimiluminescente foi realizada empregando-se o detector (fotodiodo) de um espectrofotômetro.^{45,46}

2.3.3 - Avaliação do efeito de catalisadores em diferentes condições reacionais

Diversos catalisadores empregados na reação quimiluminescente (luminol- H_2O_2) são descritos na literatura.^{4,29} Entre eles se destacam alguns metais de transição (Ni(II), Co(II), Cu(II), etc) o hexacianoferrato(III) de potássio ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) e a enzima peroxidase. Porém, os estudos mecanísticos quanto à participação destes catalisadores na reação não são conclusivos. Além disso, dependendo do sistema empregado para o monitoramento (fotomultiplicadora e/ou fotodiodo), além do modo de preparo, pH do meio reacional, ordem de

adição dos reagentes e tempo de uso dos reagentes, os resultados podem variar.^{5,14} Outro fator importante observado na literatura⁴⁷ refere-se ao comportamento da intensidade da luminescência em função da concentração de peróxido de hidrogênio, na presença de catalisadores. Com hexacianoferrato(III) de potássio como catalisador, a intensidade da luminescência foi proporcional a concentração de peróxido entre 10^{-8} a 10^{-4} mol L⁻¹. Já com a enzima peroxidase, uma relação linear entre a magnitude de emissão com o quadrado de concentração de peróxido de hidrogênio foi observado.

Com base nos diagramas de fluxo apresentados na literatura^{37,48} algumas configurações foram avaliadas, em estudos prévios, como: a reação prévia do luminol e catalisador em um bobina anterior a inserção do catalisador, além das outras combinações possíveis destas três substâncias químicas. Com base nos resultados obtidos nestes estudos, a configuração do módulo de análise apresentado na Figura 2.6, no qual no ponto de confluência x todas as soluções (luminol, catalisador e H₂O₂) eram introduzidas, foi proposta.

Os catalisadores Ni(II), Mn(II), Co(II), Cu(II), Zn(II), Fe(CN)₆³⁻ e a enzima peroxidase foram avaliados em diferentes condições reacionais de pH (9,1, 10,1 e 11,0), empregando-se o módulo de análise construído (Fig. 2.6). Dos catalisadores avaliados não foi possível a detecção da radiação luminescente com o fotodiodo de silício, quando empregou-se níquel(II) e manganês(II) na catalise da reação quimiluminescente.

Todos os catalisadores inorgânicos avaliados (metais de transição e o ferricianeto de potássio) apresentaram maiores sinais analíticos com o aumento do valor do pH do meio reacional (Figura 2.9). Já a enzima peroxidase apresentou maior eficiência catalítica da reação quimiluminescente no pH 10,1. Este comportamento sugere que embora o meio alcalino favoreça a reação quimiluminescente a estrutura proteica da enzima é afetada em condições reacionais de pH superiores a 7-8. Em valores de pH superiores (no caso 10,1) a desnaturação da enzima é intensificada.

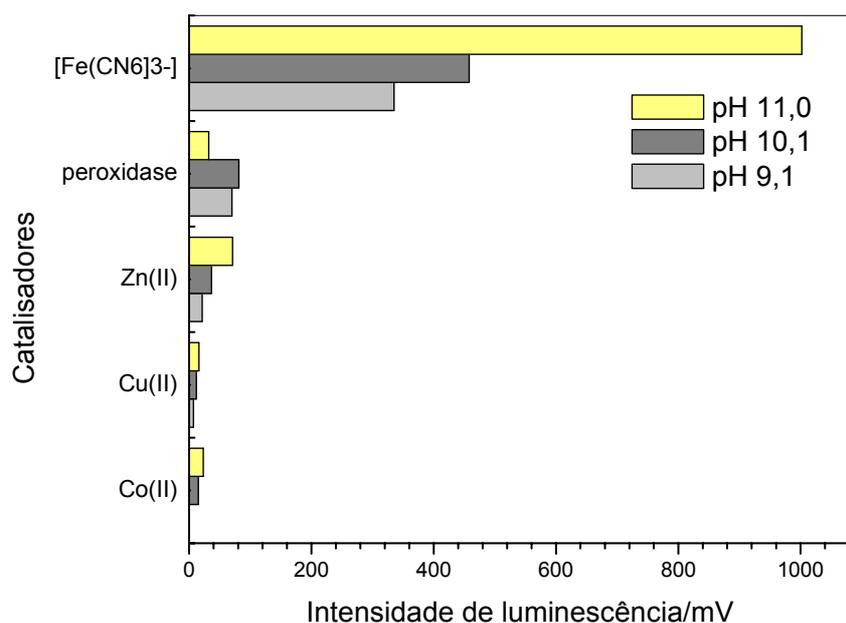


Figura 2.9- Influência dos catalisadores na magnitude da luminescência da reação luminol/H₂O₂/catalisador em diferentes condições reacionais (pH 9,1, 10,1 e 11,0), empregando o sistema em fluxo (Fig. 2.6) nas seguintes condições: R₁ = soluções de luminol 3,0 mmol L⁻¹, R₂ = solução de peróxido de hidrogênio 2,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹; R₃ = solução dos catalisadores 20,0 mmol L⁻¹, C = água; vazão das soluções 3,0 mL min⁻¹; tempo de acionamento das válvulas V₁-V₄ por determinação = 4,0 s.

O maior sinal analítico foi obtido com o ferricianeto de potássio, (Fe(CN)₆³⁻) em pH 11,0. Esse catalisador, bem como o Zn(II) e a enzima peroxidase, podem ser empregados para a determinação de H₂O₂ por quimiluminescência empregando-se o fotodiodo de silício.

A enzima peroxidase empregada neste estudo como catalisador biológico, foi obtida da batata doce, sendo que os procedimentos de extração e pré-purificação utilizados estão apresentados no Apêndice.

Estabelecidas algumas condições preliminares da reação quimiluminescente, o sistema foi otimizado e aplicado na determinação de peróxido de hidrogênio em amostras farmacêuticas. O catalisador empregado nos estudos posteriores foi o hexacianoferrato(III) de potássio, em virtude do maior sinal analítico proporcionado por este reagente.

2.3.4 – Otimização do módulo de análise empregando o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ como catalisador na reação quimiluminescente para a determinação de peróxido de hidrogênio em amostras comerciais

2.3.4.1 – Efeito da concentração da solução de luminol

Estudou-se o efeito da concentração da solução de luminol no intervalo de 0,5 a 4,0 mmol L^{-1} sobre o sinal analítico utilizando o sistema de fluxo mostrado na Figura 2.6.

Um aumento significativo do sinal analítico foi observado até a concentração de luminol igual a 2,5 mmol L^{-1} . Acima desta concentração, o sinal de luminescência permaneceu praticamente constante (Figura 2.10). Desta forma, selecionou-se a concentração de 2,5 mmol L^{-1} de luminol nos experimentos posteriores.

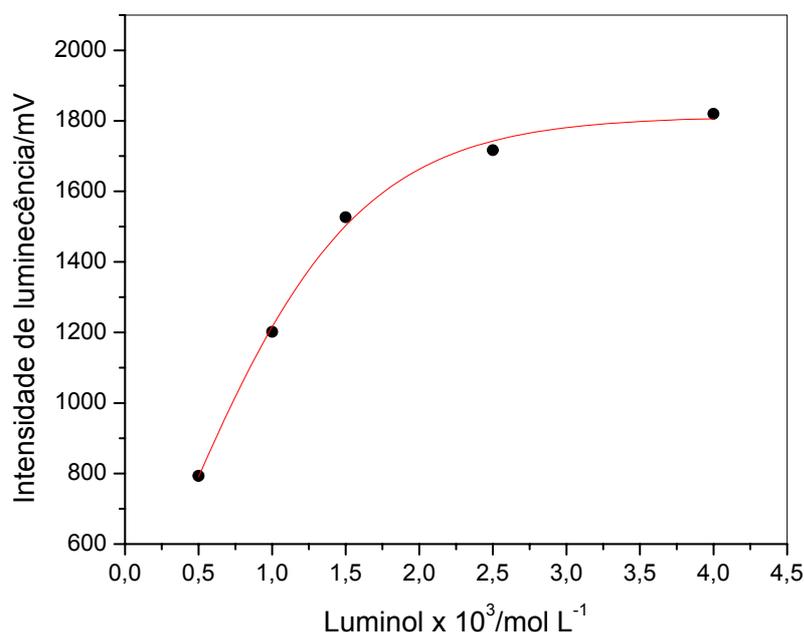


Figura 2.10 – Efeito da concentração de luminol sobre o sinal analítico empregando o sistema em fluxo (Fig. 2.6) nas seguintes condições: R_1 = soluções de luminol 0,5 – 4,0 mmol L^{-1} , R_2 = solução de peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} ; R_3 = solução de ferricianeto de potássio 20,0 mmol L^{-1} , C = água; vazão das soluções 3,0 mL min^{-1} ; tempo de acionamento das válvulas V_1 - V_4 por determinação = 4,0 s.

2.3.4.2 – Efeito da concentração da solução de hexacianoferrato(III) de potássio

Estudou-se também o efeito da concentração da solução de hexacianoferrato (III) de potássio, sobre o sinal analítico no intervalo de concentração de 5,0 a 50,0 mmol L⁻¹. A Figura 2.11 apresenta os resultados obtidos.

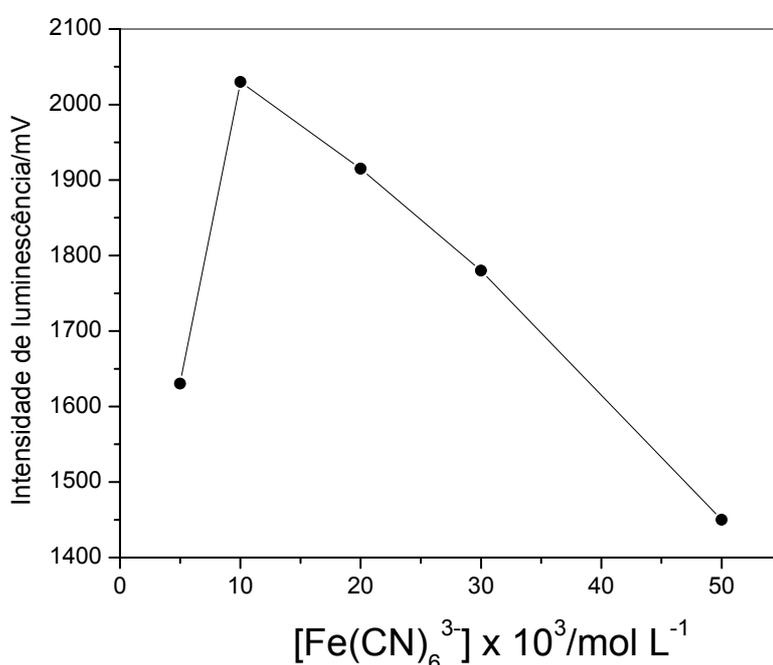


Figura 2.11 – Efeito da concentração de hexacianoferrato(III) de potássio sobre o sinal analítico empregando o sistema em fluxo (Fig. 2.6) nas seguintes condições: R₁ = soluções de luminol 2,5 mmol L⁻¹, R₂ = solução de peróxido de hidrogênio 2,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹; R₃ = solução de ferricianeto de potássio 0,5 – 50,0 mmol L⁻¹, C = água; vazão das soluções 3,0 mL min⁻¹; tempo de acionamento das válvulas V₁-V₄ por determinação = 4,0 s.

O maior sinal analítico foi observado quando a concentração da solução de hexacianoferrato(III) de potássio era de 10,0 mmol L⁻¹. Com o aumento da concentração da solução de luminol de 20 a 50 mmol L⁻¹, o sinal analítico decresceu. Esse decréscimo de sinal pode ser atribuído a absorção da radiação

luminescente pelo excesso de hexacianoferrato(III) na solução. Em estudos posteriores, selecionou-se então uma solução de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de hexacianoferrato(III) de potássio.

2.3.4.3 – Efeitos do volume dos reagentes em diferentes vazões sobre o sinal analítico

Os volumes dos reagentes inseridos no sistema analítico são definidos pela vazão de bombeamento das soluções (rotação da bomba e diâmetro dos tubos de propulsão) e pelo intervalo de tempo de acionamentos das válvulas solenóides. Foram realizados estudos de diferentes tempos de acionamento das válvulas V_1 a V_4 , nas vazões de 2,4; 3,0 e 3,6 mL min^{-1} , respectivamente. A vazão da solução transportadora (H_2O) foi mantida em 2,0 mL min^{-1} .

A resposta analítica do sistema apresentou um aumento do sinal quimiluminescente com o tempo de acionamento das válvulas solenóides de 2 a 6 s, na vazão de 2,4 mL min^{-1} e, de 2 a 4 s nas vazões de 3,0 e 3,6 mL min^{-1} . O aumento da vazão dos reagentes de 2,4 mL min^{-1} para 3,0 mL min^{-1} gerou um aumento significativo do sinal analítico (Figura 2.12). Provavelmente, este aumento de vazão proporcionou uma menor dispersão dos reagentes dentro da cela de medida (100cm) e conseqüentemente uma maior concentração dos reagentes para a reação quimiluminescente. Vazões maiores que 3,0 mL min^{-1} não proporcionaram aumentos significativos do sinal analítico. Portanto, o tempo de acionamento de 4 s das válvulas solenóides e vazões de 3,0 mL min^{-1} para os reagentes foram escolhidos para estudos futuros. Esses parâmetros estabelecidos implicam em alíquotas de aproximadamente 200,0 μL das soluções de luminol, ferricianeto de potássio e peróxido de hidrogênio, inseridos no percurso analítico do módulo de análise.

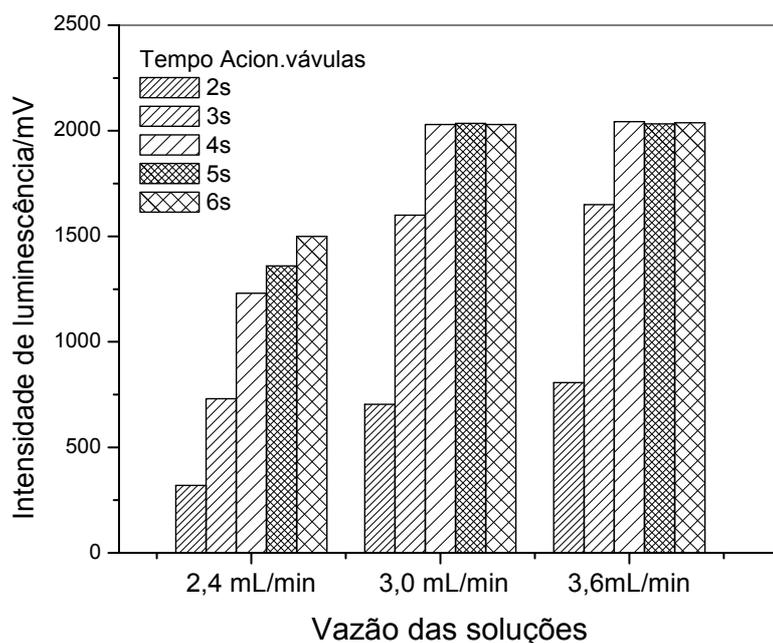


Figura 2.12 – Efeito do volume da mistura reacional (diferentes tempos de acionamento das válvulas em diferentes vazões). Os estudos foram realizados empregando o sistema em fluxo (Fig. 2.6) nas seguintes condições: R_1 = soluções de luminol $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, R_2 = solução de peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; R_3 = solução de ferricianeto de potássio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, C = água; vazão das soluções $2,4 - 3,6 \text{ mL min}^{-1}$; tempo de acionamento das válvulas V_1-V_4 por determinação = $2,0 - 6,0 \text{ s}$.

A Tabela 2.3 apresenta os resultados dos principais estudos realizados na otimização do sistema de análise em fluxo para a determinação de peróxido de hidrogênio empregando a reação quimiluminescente luminol- H_2O_2 - $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$.

TABELA 2.3 – Estudo da otimização do sistema em fluxo empregado na determinação de peróxido de hidrogênio

Parâmetro	Faixa estudada	Valor selecionado
[luminol]/ mmol L^{-1}	0,5 a 4,0	2,5
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ / mmol L^{-1}	5,0 a 50	10
Acionamento das valvulas (s)	2 a 6	4
Vazão dos reagentes / mL min^{-1}	2,1 a 3,6	3,0
Cela de medida/ cm	50 a 150	100

2.3.4.4 – Características analíticas do sistema

Uma curva analítica obtida para as soluções de referência de peróxido de hidrogênio é apresentada na Figura 2.13. As condições utilizadas para obtenção da curva analítica, estão apresentadas na Tabela 3. A curva analítica obtida, nas concentrações de $2,2 \times 10^{-6}$ a $4,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de H₂O₂, seguiu um comportamento descrito pela equação de 2ª ordem: Intensidade (mV) = $0,883 + 1,016 \times 10^7 [\text{H}_2\text{O}_2] - 6,337 \times 10^9 [\text{H}_2\text{O}_2]^2$, $R^2 = 0,999$. Nas condições otimizadas, os coeficientes de variação (RSD) foram estimados em 1,8 % e 0,6% para 10 medidas, correspondente a soluções de $7,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $6,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio, respectivamente. Os sinais transientes obtidos para as concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio, bem como aqueles utilizados na avaliação da repetibilidade da resposta são apresentados nas Figuras 2.14 e 2.15 respectivamente.

Segundo as recomendações da IUPAC⁴⁹, o cálculo do limite de detecção se baseia no desvio padrão do branco. Com base nestas informações, o limite de detecção estimado foi de $1,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

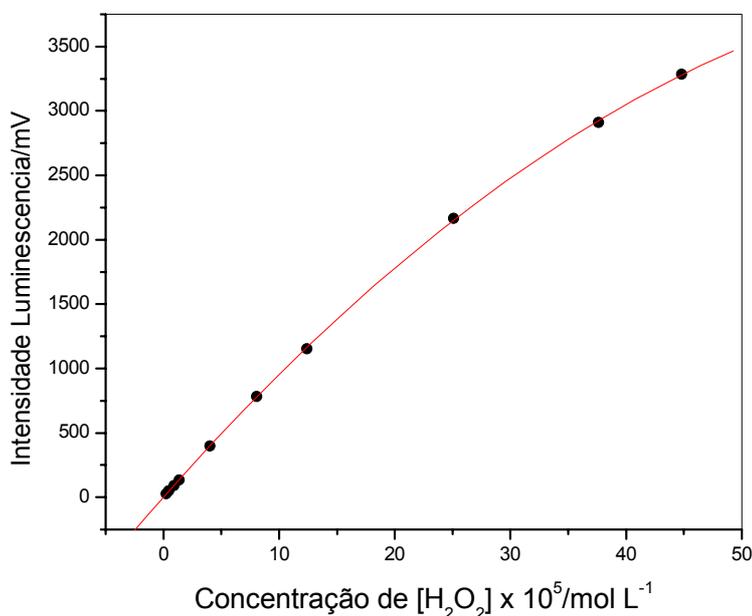


Figura 2.13 - Curva analítica para soluções de H₂O₂ entre $2,2 \times 10^{-6}$ a $4,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

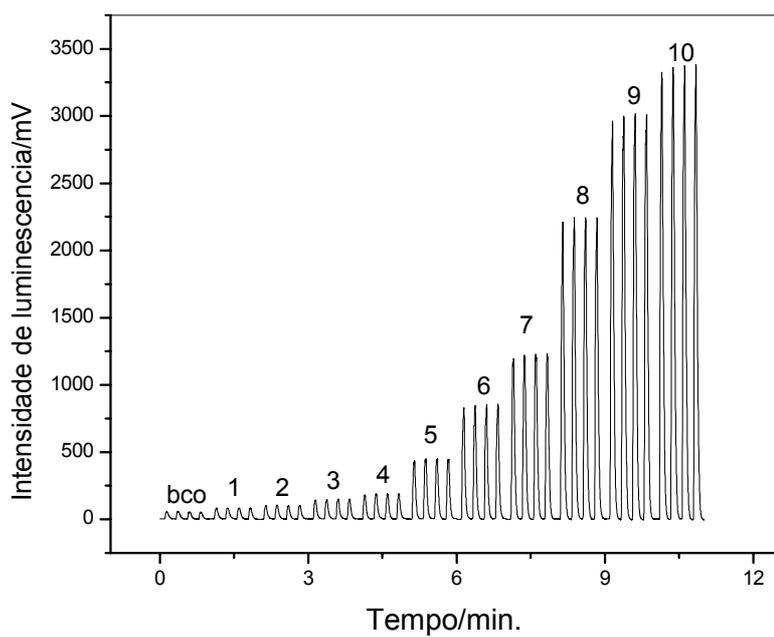


Figura 2.14 – Sinais transientes referentes às soluções padrões de H₂O₂ (1-10) de $2,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $4,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

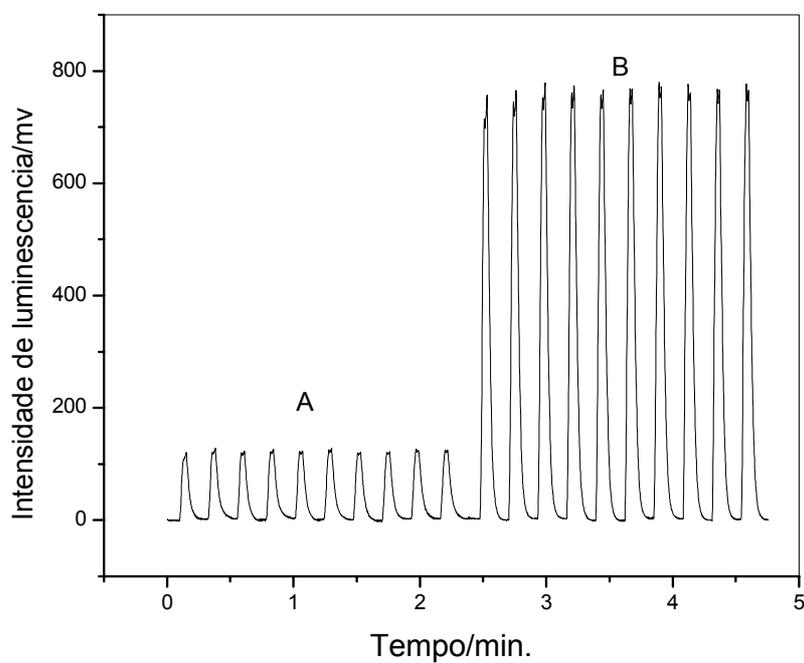


Figura 2.15 – Estudo da repetibilidade dos sinais analíticos para as soluções padrões de H₂O₂ A : $7,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e B: $6,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Na Tabela 2.4 são apresentadas as principais características analíticas do procedimento em fluxo proposto, bem como de alguns procedimentos em fluxo que empregam fotodiodos no monitoramento da radiação quimiluminescente.

TABELA 2.4 – Características analíticas do sistema em fluxo para determinação de peróxido de hidrogênio por quimiluminescência, empregando fotodiodo como detector

Parâmetro analítico	Método proposto	Leite <i>et al</i> ⁴⁴	Borges <i>et al</i> ³⁹	Rocha <i>et al</i> ⁵⁰
Linearidade ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2,2 – 213 ^a 2,2 – 450 ^b	2,5 - 315	2,5 - 500	1,0 - 80
Limite de detecção (nmol L^{-1})	1800	1000	800	400
Freqüência de amost. (deter h^{-1})	200	70	150	120
Luminol ($\mu\text{g/deter}$)	90	500	478	55
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (mg/deter)	0,7	10,6	9,8	1,0

^a comportamento linear da curva analítica

^b comportamento da curva analítica descrita por uma equação de 2^a ordem

Os sistemas analíticos em fluxo com detecção por quimiluminescência, para a determinação de H_2O_2 , apresentados na Tabela 2.4, destacam-se pela simplicidade da instrumentação necessária para a implementação dos procedimentos e freqüências de amostragem apresentadas.

Comparando os trabalhos realizados, empregando a configuração do FIA clássico^{39,44}, com o procedimento proposto, verifica-se que as linearidades de resposta obtidas nos procedimentos são muito semelhantes, apesar do trabalho de Leite *et al*⁴⁴ utilizar como detector um espectrofotômetro (fotodiodo) e Borges *et al*³⁹ empregaram dois fotodiodos de silício. Uma diferença significativa se observa entre os procedimentos, quando se compara o consumo de reagentes, que neste caso é muito menor quando se utiliza o conceito de multicomutação (em média

5 vezes menor para o luminol e 15 vezes menor para o hexacianoferrato (III) de potássio).

Verifica-se que no procedimento analítico empregando-se mini bombas solenóides⁵⁰ para o gerenciamento das soluções, foi possível minimizar ainda mais o consumo do reagente luminol,

Todos os procedimentos de uma maneira geral se destacam pela faixa de linearidade de resposta, geralmente observados nos procedimentos com detecção quimiluminescente e pela alta frequência analítica e baixo consumo de reagentes quando se utiliza os conceitos de multicomutação.

2.3.4.5 – Estudo de adição e recuperação de peróxido de hidrogênio em amostras comerciais

Nos estudos de adição e recuperação, três concentrações de peróxido de hidrogênio, a saber: $4,48 \times 10^{-6}$, $2,51 \times 10^{-5}$ e $4,03 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, foram adicionadas a 4 amostras de creme contendo peróxido de hidrogênio. Os resultados obtidos nestes estudos são apresentados na Tabela 2.5.

TABELA 2.5 - Estudo de adição e recuperação de peróxido de hidrogênio em amostras de cremes comerciais

Amostras	$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ (mol L}^{-1} \times 10^6)$		Recuperação (%)
	Adicionado	Recuperado	
1) Peróxido de hidrogênio em Creme (30 vol.)	4,48	4,51±0,20	101
	25,1	26,0±0,3	103
	40,3	40,8±0,1	101
2) Peróxido de hidrogênio em Creme (30 vol.)	4,48	4,60±0,20	103
	25,1	24,2±0,4	96,4
	40,3	42,0±0,4	104
3) Peróxido de hidrogênio em Creme (40 vol.)	4,48	4,41±0,50	98,4
	25,1	25,5±0,3	102
	40,3	40,5±0,4	100
4) Peróxido de hidrogênio em Creme (20 vol.)	4,48	4,50±0,20	100
	25,1	24,5±0,5	97,6
	40,3	40,0±0,4	99,2

n=3

Os resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação nas 4 amostras de peróxido de hidrogênio, apresentaram valores de recuperação que variaram de 96,4 a 103%, indicando assim ausência de efeito de matriz na determinação de peróxido de hidrogênio.

2.3.4.6 – Determinação de peróxido de hidrogênio em amostras comerciais empregando o sistema em fluxo com detecção quimiluminescente

O procedimento analítico desenvolvido foi aplicado na determinação de peróxido de hidrogênio em amostras comerciais. Os resultados das análises obtidas foram comparadas com o método comparativo (titulação com permanganato de potássio) e com os valores rotulados. A Tabela 2.6 apresenta os resultados obtidos empregando-se o método proposto e o método comparativo, bem como os teores de H₂O₂ rotulados.

TABELA 2.6 - Determinação de peróxido de hidrogênio em formulações comerciais pelo método quimiluminescente e pelo o método comparativo.

Amostras (% m/v)	H ₂ O ₂ (mol/L)			Erro Relativo (%)	
	Valor rotulado	Comparativo (Titulação)	Método proposto	E ₁	E ₂
Amostra 1 30 vol (9%)	2,65	2,59±0,01	2,65±0,01	0	2,3
Amostra 2 30 vol. (9%)	2,65	2,61±0,02	2,63±0,03	-0,7	0,7
Amostra 3 40 vol (12%)	3,53	3,50±0,01	3,53±0,02	0	0,8
Amostra 4 20 vol. (6%)	1,76	1,75±0,01	1,76±0,01	0	0,6

n = 3

E₁ = erro relativo entre o procedimento proposto e o valor rotulado;

E₂ = erro relativo entre o procedimento proposto e comparativo.

Avaliando o conjunto de resultados obtidos estatisticamente (aplicação do teste t pareado), não foi observada diferença estatística entre os mesmos a um nível de confiança de 95%, estando os erros relativos em um intervalo de erro aceitável.

2.4 - Conclusões

Os estudos realizados empregando-se a cela de fluxo construída com tubo de polietileno (0,8 mm de diâmetro interno), associada a um fotodiodo de silício, demonstraram o potencial do sistema para monitoramento de reações quimiluminescentes em aplicações analíticas.

A associação da detecção quimiluminescente ao sistema em fluxo construído empregando válvulas solenóides, para a determinação de peróxido de hidrogênio apresentou boa sensibilidade e linearidade de resposta, além do baixo consumo de reagentes (luminol e ferricianeto de potássio), quando comparado com os procedimentos analíticos empregando a configuração do Fia clássico. Também apresentou características analíticas similares a procedimentos analíticos quimiluminescentes construídos com mini-bombas solenóides.

CAPÍTULO 3

PROCEDIMENTO ANALÍTICO EM FLUXO COM DETECÇÃO QUIMILUMINESCENTE PARA A DETERMINAÇÃO DE GLICOSE EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS E BIOQUÍMICAS

3. Apresentação

Neste Capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica sobre os procedimentos analíticos para a determinação de glicose. Na seqüência serão apresentados os procedimentos analíticos, otimização dos sistemas em fluxo para a determinação de glicose em diferentes matrizes (sucos, mel, produtos farmacêuticos e plasma sanguíneo). Também são abordados alguns estudos sobre a imobilização da enzima glicose oxidase em suporte de sílica de porosidade controlada.

3.1 Revisão Bibliográfica

Muitos métodos para a determinação de glicose são descritos na literatura. Os métodos químicos, na maioria das vezes, se baseiam na característica redutora do grupo aldeído da glicose com certos sais e ácidos nitroaromáticos. Entretanto, dependendo da matriz da amostra analisada, estes não apresentam seletividade. A “Association of Official Analytical Chemists” descreve para a determinação de glicose, um método espectrofotométrico empregando cobre(II) em solução de biftalato de potássio em meio alcalino e também um polarimétrico.

A seguir são descritos alguns trabalhos da literatura sobre a determinação de glicose, empregando glicose oxidase imobilizada em sistemas de análise por injeção em fluxo.

NIEMAN *et al.*⁵¹ apresentaram um sistema de análises por injeção em fluxo, para a determinação de sacarose, maltose, lactose, frutose e glicose. Foram empregadas várias enzimas como a glicose oxidase, mutarrotase, invertase, glicose isomerase, lactase e amiloglicosidase. Estas enzimas foram imobilizadas e acondicionadas em diferentes reatores com dimensões de 5,6 cm x 3,0 mm. Dependendo do açúcar a ser analisado, as respectivas colunas enzimáticas eram introduzidas no percurso analítico, com o auxílio de um injetor. O peróxido de hidrogênio produzido, como produto das reações enzimáticas com os respectivos açúcares, reagia com o luminol na presença da peroxidase, sendo

a radiação emitida da reação quimiluminescente, monitorada por uma fotomultiplicadora. A curva analítica apresentou linearidade de 0,2 a 1,0 mmol L⁻¹ para os açúcares glicose, sacarose e maltose e 3,0 μmol L⁻¹ a 3,0 mmol L⁻¹ para frutose e lactose. Várias outras características da estabilidade das enzimas foram apresentadas pelos autores.

GORTON e OGRE⁵² desenvolveram um sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de glicose e uréia em amostras de soro e urina, respectivamente. O sistema em fluxo continha as enzimas glicose oxidase e urease imobilizadas, além de uma unidade de diálise, para a remoção de proteínas e outros interferentes em potencial. Para a determinação de glicose, monitorou-se espectrofotometricamente em 555 nm, um complexo colorido formado na reação entre o peróxido de hidrogênio, proveniente da oxidação da glicose pela glicose oxidase imobilizada, e os reagentes 4-aminofenazona e N,N-dimetilanilina. O intervalo linear de resposta para glicose foi de 1,6 x 10⁻⁴ a 1,6 x 10⁻² mol L⁻¹. A determinação da uréia baseou-se na sua conversão em amônia, pela urease, que foi monitorada potenciométricamente, empregando um eletrodo de vidro para medidas de pH contendo uma membrana de difusão gasosa. A resposta potenciométrica foi linear no intervalo entre 2,0 x 10⁻⁴ a 3,1 x 10⁻¹ mol L⁻¹ para uréia.

Um sistema em fluxo para o monitoramento em linha de glicose em cultura de células animal foi proposto por HUANG *et al.*⁵³ A enzima glicose oxidase foi imobilizada em sílica de porosidade controlada e o reator enzimático acoplado no sistema em fluxo. Quando uma alíquota da amostra, previamente tratada em linha por um sistema de filtração e diálise, passava pelo reator enzimático contendo glicose oxidase, o peróxido de hidrogênio era produzido e posteriormente detectado por quimiluminescência, utilizando os reagentes luminol e hexacianoferrato(III) de potássio. A curva analítica apresentou resposta linear na faixa entre 1,0 x 10⁻⁵ e 5,0 x 10⁻² mol L⁻¹ de glicose, com desvio padrão relativo de 3% (n=5). Os resultados obtidos empregando-se o procedimento proposto foram concordantes com os resultados obtidos empregando-se um procedimento *off-line*, (Yellow Springs Instrument). O reator enzimático de glicose oxidase apresentou uma estabilidade de quatro semanas e frequência de amostragem foi estimada em 20 determinações por hora.

YAO *et al.*⁵⁴ propuseram um procedimento analítico em fluxo para a determinação de glicose, ácido úrico e colesterol em amostras de soro sanguíneo. O procedimento baseou-se na detecção amperométrica do peróxido de hidrogênio produzido nas reações enzimáticas com um eletrodo de platina, modificado com um filme de poli-1,2-diaminobenzeno. A curva analítica foi linear no intervalo de 5,0 a 500 mg L⁻¹ para glicose, de 1,0 a 50 mg L⁻¹ para ácido úrico e de 5,0 a 250 mg L⁻¹ para colesterol.

Um eletrodo para a determinação de glicose em produtos farmacêuticos foi desenvolvido por MAGNA *et al.*⁵⁵ O eletrodo para glicose foi construído imobilizando-se a glicose oxidase em uma membrana de acetato de celulose que foi afixada na superfície de um eletrodo de tungstênio-óxido de tungstênio. Os íons H₃O⁺ produzidos na reação enzimática foram detectados no eletrodo de tungstênio. A curva analítica foi linear entre 2,4 x 10⁻⁴ e 1,7 x 10⁻³ mol L⁻¹, em tampão fosfato pH 5,5, com coeficiente de correlação de 0,993 e coeficiente angular de 51,3 mV/década. Os resultados obtidos empregando-se o procedimento potenciométrico foram concordantes com aqueles resultados obtidos empregando-se o procedimento espectrofotométrico em um nível de 95% de confiança.

Um sistema enzimático para determinação de glicose em sucos de frutas e soro humano com detecção eletroluminescente foi desenvolvido por LAESPADA *et al.*⁵⁶ O peróxido de hidrogênio gerado reagiu com o radical obtido pela oxidação eletroquímica do luminol no eletrodo de carbono vítreo. O limite de detecção foi de 4,3 x 10⁻⁶ mol L⁻¹. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração entre 5 e 50 µg mL⁻¹ de glicose. Uma membrana de diálise foi acoplada ao sistema em fluxo para minimizar os efeitos de matriz, melhorando a estabilidade do eletrodo, obtendo-se uma curva analítica entre 50 e 300 µg mL⁻¹. No sistema de detecção por eletroquimiluminescência, a instrumentação é mais complexa do que na quimiluminescência, pois requer um potenciostato e uma cela de medida. A maior desvantagem do método proposto é a instabilidade do eletrodo. O problema é acentuado quando as amostras incluem matrizes complexas, como soro sanguíneo. Mesmo utilizando-se uma membrana de diálise, o sinal permaneceu estável por 2 h, após esse tempo diminuiu progressivamente, e só pode ser recuperado polindo-se a superfície do eletrodo.

Um sistema SIA para o monitoramento de glicose e penicilina, em um reator contendo micélios de fungos foi proposto por MIN *et al*⁵⁷. O sistema consistiu de uma bomba peristáltica, uma válvula de injeção, duas bombas de pistão, duas válvulas de multiposição e dois detectores, um quimiluminescente e outro espectrofotométrico. O monitoramento da glicose foi realizado de forma indireta, pela determinação do peróxido de hidrogênio, produzido na reação da glicose com a glicose oxidase, por quimiluminescência. A determinação de penicilina foi baseada na formação de ácido penicilóico pela enzima penicilinase. O ácido penicilóico foi detectado por quimiluminescência e por espectrofotometria (descolorimetria). No método quimiluminescente, o ácido penicilóico foi quantificado pelo efeito quelante no sinal quimiluminescente obtido quando o luminol reagiu com o iodo. No método espectrofotométrico, o ácido penicilóico foi detectado espectrofotometricamente pela diminuição da absorbância do complexo iodo-amido. Os autores não apresentaram as principais características analíticas do sistema proposto como exatidão, precisão e consumo de reagentes. O sistema apresentou frequência analítica de 15 determinações por hora.

Um sistema em fluxo para a determinação de glicose em amostras de sangue, com detecção amperométrica foi proposto por MILARDOVIC *et al*.⁵⁸ A enzima glicose oxidase e o reagente ferricianeto de potássio foram imobilizados na superfície de um eletrodo de níquel. O peróxido de hidrogênio, gerado na oxidação da enzima, reagia com o ferricianeto. O par hexacianoferrato(III)/hexacianoferrato(II) era regenerado eletroquimicamente em potências de -100 mV. O eletrodo mostrou resposta linear entre 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 2,9 mmol L^{-1} , uma vida útil de aproximadamente 3 meses com decréscimo de 30% na sensibilidade.

QIN *et al*,⁵⁹ descreveram um método para a determinação de peróxido de hidrogênio em águas de chuva e glicose em soro empregando análise por injeção em fluxo (FIA). Esses autores empregaram duas bombas peristálticas, uma cela em espiral para detecção quimiluminescente e enzima glicose oxidase imobilizada em esferas de vidro. Os reagentes luminol e cobalto(II) foram imobilizados em resinas de troca aniônica fortemente básica e de troca catiônica fracamente ácida, respectivamente. O método proposto para a determinação de peróxido de hidrogênio apresentou características analíticas

como linearidade entre $4,0 \times 10^{-8}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, limite de detecção de $1,2 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, desvio padrão relativo inferior a 5% e frequência de amostragem de 50 determinações por hora. Para a determinação de glicose, os autores obtiveram linearidade entre $5,0 \times 10^{-7}$ e $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, limite de detecção de $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com desvio padrão relativo de 4%. Nesse procedimento, observa-se um volume de efluente gerado de 7 mL por determinação.

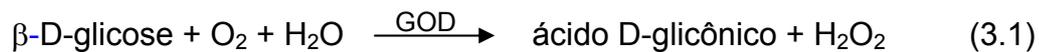
CHEN *et al.*⁶⁰ desenvolveram um método fluorescente para a determinação de glicose pela junção da reação fluorescente de ácido p-hidroxifenilacético e H₂O₂, e *hemin* como catalisador. A glicose pode produzir H₂O₂ em solução quando irradiada com luz UV, mesmo na ausência da glicose oxidase. No procedimento proposto foi observada linearidade entre 0,1 e 6×10^{-7} mol L⁻¹ de glicose, limite de detecção de $1,7 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, desvio padrão relativo de 3,9% (n=6), para a determinação de 1×10^{-7} mol L⁻¹ de glicose.

Um sistema microfluidico acoplado a um biossensor quimiluminescente foi proposto por ZHANG *et al.*⁶¹ para a determinação de glicose em soro humano. A glicose oxidase foi imobilizada em sílica de porosidade controlada e acondicionada dentro de um reservatório. Os reagentes analíticos, luminol e ferrocianeto, foram co-imobilizados eletrostaticamente em resina de troca aniônica. A enzima e os reagentes foram acondicionados no *chip* de dimensões de 25x45x5mm. A glicose foi determinada pela reação quimiluminescente entre o peróxido de hidrogênio produzido pela reação enzimática e os reagentes quimiluminescentes e, detectados por um luminômetro. No procedimento proposto foram observadas características analíticas de linearidade entre 1,1 e 110 mmol L⁻¹, limite de detecção de 0,1 mmol L⁻¹, desvio padrão relativo de 5,5 mmol L⁻¹ e frequência de amostragem foi de 12 determinações por hora.

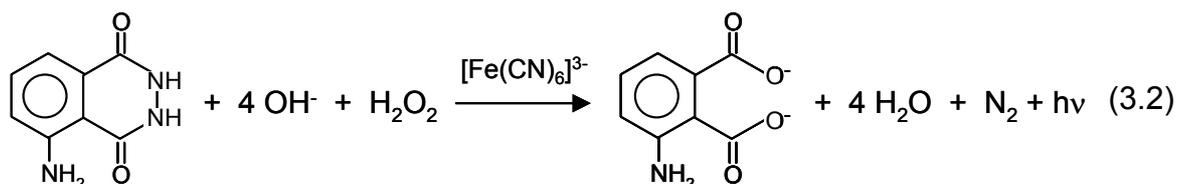
3.2 Parte Experimental

3.2.1- Princípio do método

Inicialmente a glicose é oxidada, na presença de oxigênio, pela enzima glicose oxidase, produzindo ácido glicônico e peróxido de hidrogênio conforme mostrado na reação 3.1.



Posteriormente, o H_2O_2 produzido (oxidante forte), reage com o luminol na presença do hexacianoferrato(III) de potássio (catalisador), conforme e mostrado na reação 3.2.



A magnitude da radiação luminescente medida, é então relacionada com a concentração de peróxido de hidrogênio ou glicose na amostra.

3.2.2 – Equipamentos e acessórios

Para construção dos módulos de análise foram empregados tubos de polietileno (0,8 mm d.i) e confluências feitas de acrílico. A propulsão dos fluidos foi feita com uma bomba peristáltica Ismatec (IPC-8), equipada com tubos de propulsão de Tygon de diferentes diâmetros. O controle do módulo de análise e aquisição de dados foram realizados empregando-se um microcomputador (Pentium 233 MHz), equipado com uma interface eletrônica (Advantec Corp., PCL-711S). A linguagem de programação foi LabVIEW 7.0. As medidas da radiação quimiluminescente (expressas em mV) foram feitas empregando um fotodetector OSD 50-E e uma cela de medida de polietileno como descrito no item 2.3.2.

3.2.3 – Reagentes e soluções

3.2.3.1 – Reagentes e soluções empregados no estudo da imobilização da enzima glicose oxidase

Neste estudo, foram empregadas sílica de porosidade controlada com diâmetro de poro de 170 Å (200-400 mesh), enzima glicose oxidase (50000 –

80000 U/gm de sólido), Glutaraldeído 25% (v/v) e 3-aminopropiltrietoxisilano (APTS) , todos os reagentes procedentes da Sigma.

3.2.3.2 - Reagentes e soluções empregados na otimização do procedimento em fluxo para a detecção de glicose

As soluções foram preparadas empregando água desionizada e reagentes de grau analítico.

A solução de carbonato de sódio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$, pH 11,0 foi preparada dissolvendo-se 11,056 g de K_2CO_3 em água. O pH foi ajustado com solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e o volume completado para 200 mL.

A solução estoque de luminol $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 320,0 mg de 5-amino-2,3-dihidro-1,4 ftalazinediona (Sigma) em 200 mL de solução de carbonato de potássio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 11,0). A solução foi preparada 3 dias antes do uso e armazenada em frasco âmbar mantida sob refrigeração. A solução de trabalho na concentração de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de luminol foi preparada por diluição apropriada da solução estoque em solução de carbonato de sódio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução estoque de hexacianoferrato(III) de potássio $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 4,132 g do sal (Reagen) em 500 mL de água desionizada. A solução de trabalho na concentração de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de hexacianoferrato(III) de potássio foi preparada por diluição apropriada da solução estoque em água desionizada.

Soluções estoque de glicose 2500 mg L^{-1} foram preparadas dissolvendo-se 0,250g de glicose em 100,0 mL de água desionizada. Esta solução foi mantida em repouso por 24 h, para atingir o equilíbrio entre as formas α e β da glicose. As soluções de referência de glicose em concentrações variando de 2,5 a $500,0 \text{ mg L}^{-1}$ foram preparadas por diluições da solução estoque.

3.2.3.3 – Preparo das amostras de mel, suco e soro glicosado

As amostras de mel de laranjeira e xarope de glicose (Karo®) foram pesadas (1,0g) e solubilizadas em solução tampão fosfato $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

Posteriormente foram sucessivamente diluídas até um fator de diluição de 25000 vezes.

As amostras de suco de uva e tomate foram diluídas 500 vezes em solução tampão fosfato $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

As amostras de soro glicosado (produto farmacêutico) foram 1000 vezes diluídas em solução tampão fosfato $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

3.2.3.4 – Preparo das amostras de plasma sanguíneo

As amostras de plasma sanguíneo, previamente preparadas, foram fornecidas pelo Laboratório de Análises Clínicas Dr. Maricondi, em frascos de plástico fechados com volumes de aproximadamente 2,0 mL.

3.2.4 - Procedimento Experimental

3.2.4.1- Imobilização da glicose oxidase

A imobilização da glicose oxidase em sílica de porosidade controlada (CPG) envolve várias etapas. A Figura 3.1 resume as etapas envolvidas na imobilização dessa enzima na sílica. Dependendo do tipo de sílica disponível, a etapa de silanização pode ser suprimida (algumas sílicas comerciais já vêm silanizadas).

A Etapa1, silanização compreende o ancoramento de grupos funcionais (grupos amino) nas esferas de sílica. O reagente comumente empregado nesta etapa é o ATPS (3-aminopropiltrióxido de silano). Na Etapa 2, ativação, o reagente bifuncional glutaraldeído reage com os grupos amino formando as bases de "Schiff". A etapa 3, imobilização da enzima de interesse, compreende a reação entre os grupos amino da enzima, com o grupo aldeído livre na sílica. Há informações variadas na literatura sobre o procedimento de imobilização de enzimas em sílica de porosidade controlada. Essas informações são dependentes das etapas envolvidas na imobilização, bem como das concentrações dos reagentes e tempo de silanização, ativação e imobilização. Portanto, a fim de estabelecer uma metodologia de imobilização, dentro das condições desse trabalho, foram realizados diversos estudos sistemáticos, a fim

de seleccionar as variáveis mais relevantes na imobilização da glicose oxidase. Parâmetros como a concentração e tempo de reação de ATPS e glutaraldeído, foram avaliados pela eficiência de imobilização da proteína ao suporte. Os estudos iniciais foram realizados a partir de um planejamento fatorial 2^4 , apresentado na Tabela 3.1.

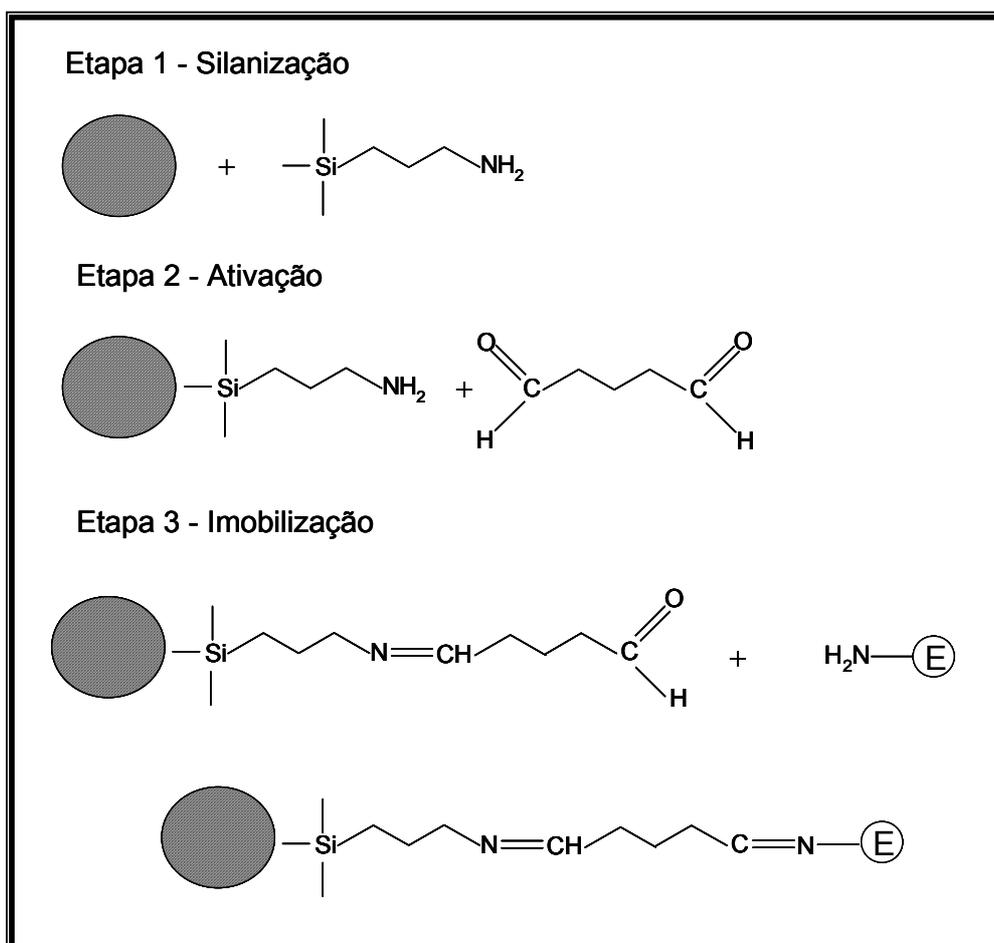


Figura 3.1 – Etapas envolvidas na imobilização de enzimas em sílica de porosidade controlada (CPG)

Numa primeira etapa, a sílica foi silanizada com o reagente 3-aminopropiltriétoxissilano (ATPS) nas concentrações de 1,5% (v/v) e 3,5 % (v/v) nos tempos de reação de 20 e 40 min. Para cada 100 mg de sílica, foi utilizado 2,0 mL da solução de ATPS. Após os tempos de reação, a solução de ATPS foi retirada com o auxílio de uma seringa e a sílica silanizada colocada numa estufa, primeiramente a 80 °C por 6 h e posteriormente a 110 °C por 8 h. A etapa de ativação foi realizada com a solução de glutaraldeído (1,5 e 3,5%) em diferentes

tempos de reação, 20 e 40 min. Transcorrido o tempo de ativação, a sílica foi lavada com uma solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 6,5), para retirar o excesso do reagente glutaraldeído. Na imobilização da enzima, etapa 3, a sílica (100 mg) ficou em contato com 2 mL de uma solução de glicose oxidase contendo 1,25 mg de proteína/mL, durante os tempos de 2 e 6 horas. Para verificar a quantidade de proteína que ficou imobilizada, subtraiu-se a concentração de proteína encontrada no sobrenadante, daquela inicial.

TABELA 3.1- Planejamento fatorial com valores reais das variáveis concentração de ATPS, tempo 1 (reação da sílica com ATPS), concentração de glutaraldeído e tempo 2 (reação da sílica silanizada com glutaraldeído).

Nº Exp.	ATPS (%)	Tempo 1 (min)	Glutaraldeído (%)	Tempo 2 (min)
1	3,5	40	3,5	40
2	3,5	40	3,5	20
3	3,5	40	1,5	40
4	3,5	40	1,5	20
5	3,5	20	3,5	40
6	3,5	20	3,5	20
7	3,5	20	1,5	40
8	3,5	20	1,5	20
9	1,5	40	3,5	40
10	1,5	40	3,5	20
11	1,5	40	1,5	40
12	1,5	40	1,5	20
13	1,5	20	3,5	40
14	1,5	20	3,5	20
15	1,5	20	1,5	40
16	1,5	20	1,5	20

3.2.4.2 – Diagrama do módulo de análise em fluxo para a determinação quimiluminescente de glicose em sucos, mel e soro glicosado

O diagrama de fluxo do módulo de análise construído para a determinação de glicose em mel, soro glicosado, suco de uva e de tomate é apresentado na Figura 3.2. Este módulo é constituído de 4 válvulas solenóides (V_1 , V_2 , V_3 e V_4) que controlam a inserção das soluções de reagentes e do transportador. A válvula solenóide é representada por um círculo com duas linhas que indicam os possíveis percursos das soluções e/ou transportador. A linha cheia representa a passagem livre para a solução enquanto a linha tracejada indica a via alternativa quando a válvula é acionada. Desta forma, na posição indicada na Figura 3.2, apenas a solução transportadora está fluindo pelo sistema.

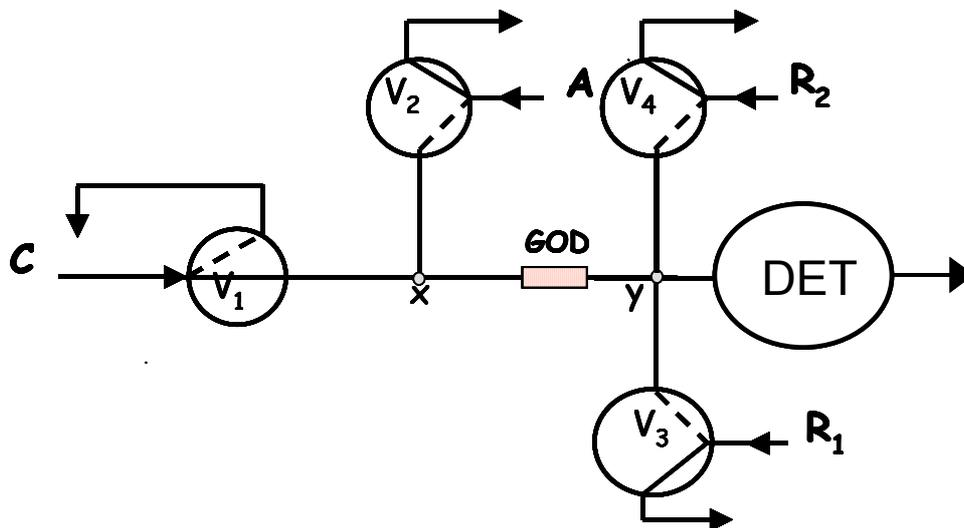


Figura 3.2 – Módulo de análise em fluxo para a determinação de glicose: válvulas solenóides de três vias: V_1 = controle da solução transportadora C (solução tampão fosfato $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,5; V_2 = controle de injeção da solução de amostra e/ou padrões de glicose; V_3 = controle da solução de luminol e V_4 = controle da solução de hexacianoferrato (III) de potássio; ponto de confluência = y; coluna enzimática = GOD e sistema de detecção quimiluminescente (DET).

O funcionamento do módulo de análise é muito simples e pode ser resumido em alguns passos. Inicialmente, todas as válvulas estão desligadas e (como a válvula do transportador é ligada de forma invertida) apenas a solução

transportadora flui pelo percurso analítico. Para a introdução de uma alíquota de amostra ou padrão no sistema, as válvulas V_1 e V_2 são acionadas durante um tempo pré-determinado. Assim o fluxo da solução transportadora é interrompido (válvula V_1) e a solução de glicose seja introduzida no percurso analítico. A solução de glicose é então transportada pelo carregador em direção à coluna no qual está imobilizada a glicose oxidase (GOD). As válvulas V_3 e V_4 são então acionadas e as soluções dos reagentes luminol e hexacianoferrato(III) de potássio são introduzidas no sistema. Ocorre a mistura e reação com o peróxido de hidrogênio, produzido na reação enzimática, que produz uma luminescência que é então monitorada pelo fotodiôdo de silício.

O percurso analítico entre o ponto de confluência x e a entrada da cela de detecção foi estabelecido em 20 cm. O reator enzimático contendo glicose oxidase imobilizada possui as dimensões de 2,0 cm x 3,0 mm, e a cela de medida é um tubo de polietileno contendo 100 cm de comprimento e 0,8 mm di.

Foram realizados vários experimentos com o módulo de análise descrito, a fim de se otimizar os parâmetros envolvidos no desenvolvimento da reação enzimática e luminescente para a determinação de glicose em mel, xarope de glicose, soro glicosado, suco de uva e de tomate. Avaliou-se a influência do volume de amostra e dos reagentes quimiluminescentes, além da concentração hidrogênioica (pH) sobre a catálise enzimática. Após a otimização dos principais parâmetros físico-químicos envolvidos, foram realizados estudos de adição e recuperação nas amostras e a quantificação de glicose nas amostras de mel, xarope de glicose, soro glicosado, suco de uva e tomate. Por fim, avaliou-se a estabilidade da coluna enzimática.

3.2.4.3 – Diagrama do módulo de análise em fluxo para a determinação quimiluminescente de glicose em plasma sanguíneo

Para a determinação de glicose em plasma sanguíneo, o módulo de análise apresentado na Figura 3.3 foi proposto. Este módulo é constituído de 5 válvulas solenóides (V_1 , V_2 , V_3 , V_4 e V_5) que permitem a inserção das soluções de reagentes e do transportador. Uma alça de amostragem L_1 de 25 μL e uma bobina de dispersão de 100 cm (B_1) foram empregadas no percurso analítico, em função do pequeno volume de amostra e, que os resultados obtidos se projetassem

dentro de uma faixa de concentração pré- estabelecida. O descarte das soluções, bem como a solução do sistema de injeção hidrodinâmica, foram realizados em um frasco contendo solução de hipoclorito de sódio 5% v/v.

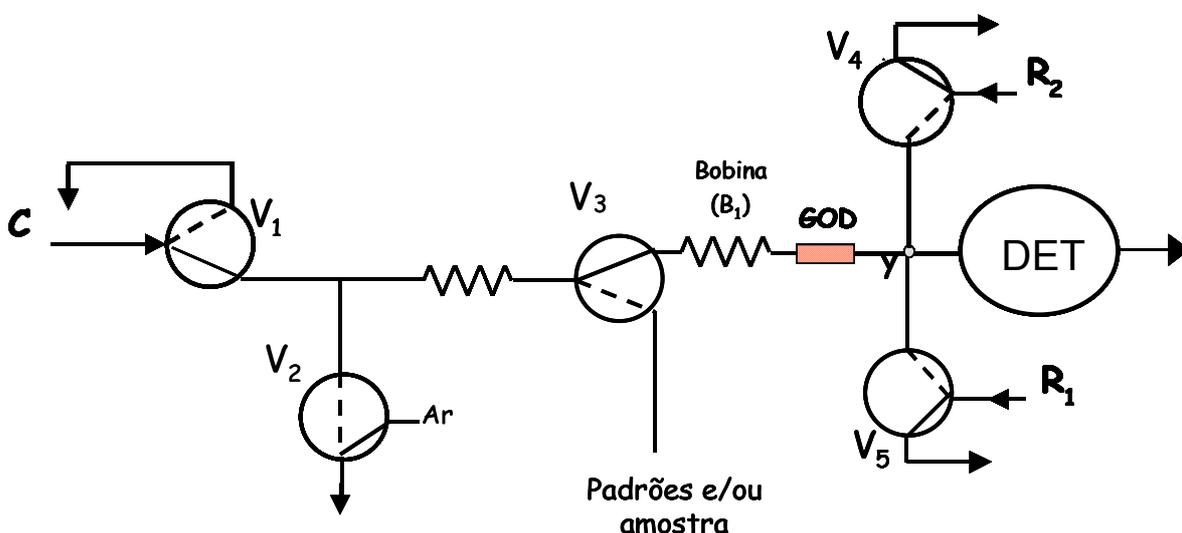


Figura 3.3 – Módulo de análise em fluxo para a determinação de glicose: válvulas solenóides de três vias: V_1 = controle da solução transportadora C (solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5); V_2 e V_3 = controle da solução de amostra e/ou padrões de glicose; V_4 = controle da solução de luminol e V_5 = controle da solução de hexacianoferrato(III) de potássio; y = ponto de confluência; coluna enzimática = GOD e sistema de detecção quimiluminescente DET).

O funcionamento do módulo de análise pode ser resumido em alguns passos. Inicialmente todas as válvulas estão desligadas e, como a válvula do transportador é ligada de forma invertida, apenas a solução transportadora flui pelo percurso analítico. Para a introdução de uma alíquota de amostra ou padrão no sistema, as válvulas V_1 , V_2 e V_3 são acionadas durante um tempo pré-determinado, assim o fluxo da solução transportadora é interrompido (válvula V_1) a válvula V_2 quando acionada, funciona como um vácuo, permitindo assim que a solução de glicose seja introduzida no percurso analítico pela válvula V_3 , até preencher a alça de amostragem L_1 . A quantidade de solução de glicose inserida, depende do tamanho da alça de amostragem L_1 . Após o preenchimento da alça de amostragem, a solução de glicose é transportada pelo carregador em direção à coluna no qual está imobilizada a glicose oxidase (GOD). As válvulas V_4 e V_5

são acionadas e os reagentes luminol e hexacianoferrato(III) de potássio são introduzidos no sistema. Ocorre a mistura e reação destes reagentes com o peróxido de hidrogênio, produzindo a quimiluminescência que é então monitorada.

Estudos preliminares foram realizados a fim de se definir o tamanho da alça de amostragem L_1 e da bobina de dispersão B_1 . Posteriormente em função da mudança do percurso analítico, foram realizados estudos do tempo de espera “delay” para o acionamento das válvulas que gerenciam a inserção dos reagentes luminol e hexacianoferrato(III) de potássio. Também foram otimizados os volumes destes reagentes inseridos no percurso analítico. Por fim, estudos de adição e recuperação da amostra e quantificação de glicose em plasma sanguíneo foram realizados.

3.2.4.4 – Método comparativo

O método comparativo empregado para a análise de glicose foi o método enzimático com detecção espectrofotométrica realizado com um kit comercial da empresa LABORLAB CAT nº 02200⁶². O princípio do método é apresentado nas equações abaixo.

Inicialmente a enzima glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose, formando ácido glicônico e peróxido de hidrogênio (equação 3.1).



Na seqüência, o peróxido de hidrogênio formado reage com o 4-aminoantipirina e fenol, catalisado pela enzima peroxidase (PE) (eq. 3.2), formando um produto, antipirilquinonimina, de coloração avermelhada, cuja intensidade, monitorada em 530 nm, é correlacionada com a concentração de glicose na amostra.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1 –Imobilização da glicose oxidase no suporte de sílica

Para avaliar a influência dos parâmetros envolvidos nas diferentes etapas da preparação do suporte para a imobilização da enzima (glicose oxidase), como a concentração dos reagentes e tempo de reação, foram realizados inicialmente 16 experimentos empregando planejamento fatorial, sendo os resultados apresentados na Tabela 3.2.

TABELA 3.2- Resultados obtidos no Planejamento Fatorial, expresso em quantidade de proteína imobilizada/grama de sílica, tempos de imobilização de 2 e 6 horas

Nº Exp.	Imobilização (2 horas)	Imobilização (6 horas)
	Proteína (mg/g sílica)	Proteína (mg/g sílica)
1	2,13	6,15
2	1,35	5,48
3	2,13	6,39
4	2,16	5,47
5	2,18	5,83
6	2,34	5,42
7	1,40	6,11
8	1,23	4,96
9	0,45	5,75
10	-	2,50
11	-	2,39
12	0,51	1,36
13	0,99	1,63
14	1,83	1,04
15	1,07	2,23
16	0,86	1,32

Os resultados obtidos fornecem informações sobre qual ou quais são as variáveis importantes e se existe interações significativas nas etapas de silanização e ativação do suporte. A partir dos resultados obtidos, expressos em quantidade de proteína imobilizada por grama de sílica (Tabela 3.2), iniciou-se a análise destes dados, com o auxílio de uma ferramenta estatística computacional STATGRAFIC PLUS. O gráfico de pareto apresentado na Figura 3.4 descreve a relevância de cada variável e as possíveis interações, resultado esse obtido a

partir da análise de variância do planejamento experimental. A linha localizada na abscissa ($\approx 3,2$) representa o erro padrão experimental, sendo que somente as variáveis com valores além deste limite são consideradas estatisticamente significativas. Observou-se que somente a variação da concentração de ATPS de 1,5% para 3,5% apresentou um significativo ganho de proteína imobilizada.

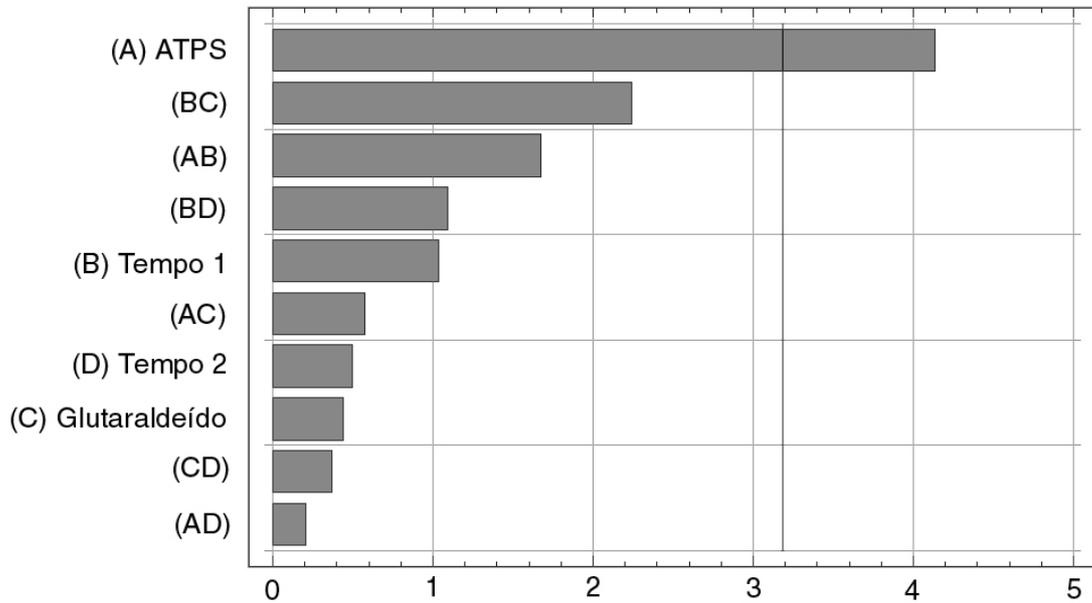


Figura 3.4 - Gráfico de Pareto obtido da análise das variáveis estudadas e suas interações.

Uma forma de se avaliar a influência das variáveis e suas interações é o emprego de diagramas contendo as respostas médias das combinações e os níveis das variáveis estudadas, como apresentado na Figura 3.5

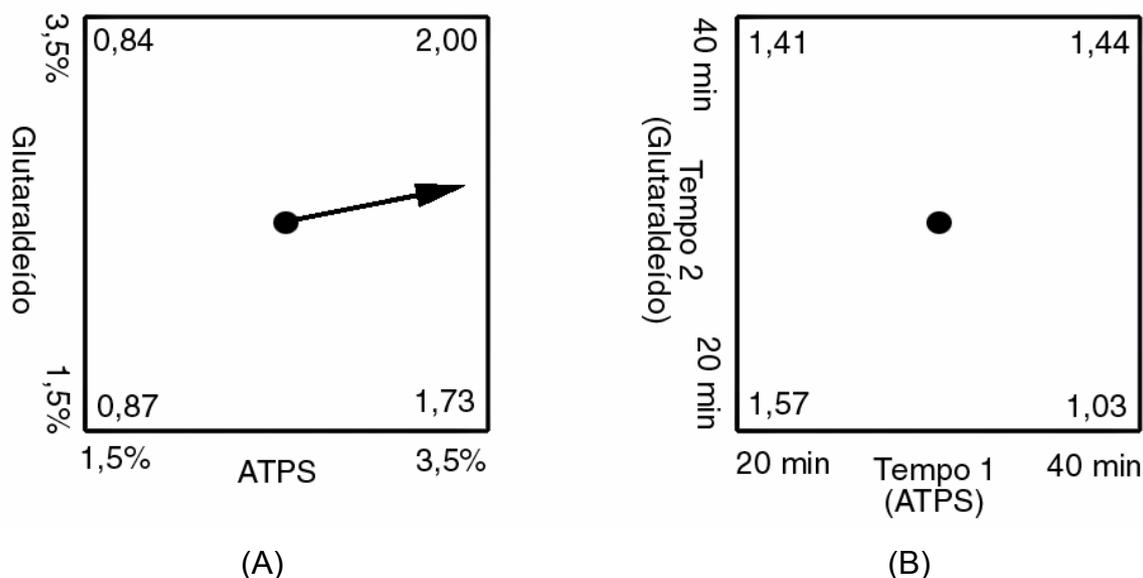


Figura 3.5- Teores de proteína imobilizada (mg de proteína/g de sílica) empregando diferentes concentrações de reagentes (A) e tempos de reação (B).

Examinando esse diagrama pode-se concluir que:

- 1) O aumento da concentração de ATPS melhora a imobilização da enzima, sendo que esse efeito não é alterado com a variação da concentração de glutaraldeído (1,73 a 2,00), demonstrando não haver interação entre as variáveis.
- 2) A variação da concentração de glutaraldeído de 1,5 a 3,5% v/v não teve influência na imobilização da enzima.
- 3) O maior rendimento de imobilização foi obtido empregando 3,5% v/v de ATPS e concentrações de glutaraldeído de 1,5 a 3,5% v/v.
- 4) A variação do tempo de reação de 20 e 40 min do ATPS e do glutaraldeído com a sílica, demonstra não haver influencia na imobilização da enzima.

As variáveis concentração e tempo de reação do glutaraldeído não se mostraram estatisticamente significativas, assim é possível utilizar tempos de 20 min e uma concentração em torno de 2,5% v/v de glutaraldeído, sem perda da eficiência da imobilização.

Os primeiros estudos realizados para avaliar e definir as variáveis mais significativas que envolvem a imobilização da enzima foram realizados empregando-se um tempo de imobilização da enzima no suporte de 2 h. Portanto, a fim de se verificar qual a influência do tempo de imobilização da enzima no suporte, repetiu-se o planejamento experimental apresentado na Tabela 3.2,

porém empregando um tempo de 6 h na imobilização da enzima (etapa 3). A união do planejamento fatorial com 2 h e 6 h de imobilização da enzima, forneceu um novo planejamento com dois níveis e 5 variáveis (2^5), totalizando 32 experimentos.

Os resultados obtidos com o novo planejamento foram avaliados, e os principais efeitos são apresentados no gráfico de pareto da Figura 3.6. Analisando-se o gráfico mostrado na Figura 3.6, observa-se que a concentração de ATPS ainda possui significância estatística, porém acompanhado da influência do tempo de imobilização da enzima e uma interação entre ambos. O efeito de interação significativo, indica que os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente, pois a variação de um parâmetro influencia o desempenho da outra variável.

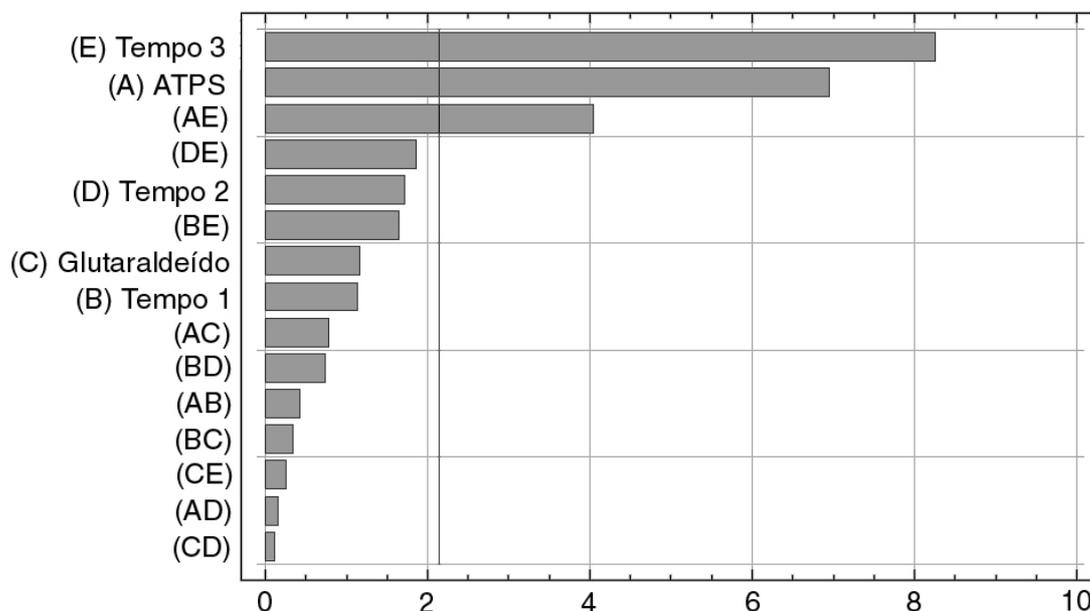


Figura 3.6 - Gráfico de relevância das variáveis estudadas e suas interações.

Avaliando as interações na forma de diagramas, Figura 3.7, observou-se que ambas possuem significativo incremento de imobilização quando efetuadas, empregando-se 3,5% de ATPS e 6 h de imobilização da enzima. Porém, a maior influência foi observada no tempo de imobilização da enzima no suporte.

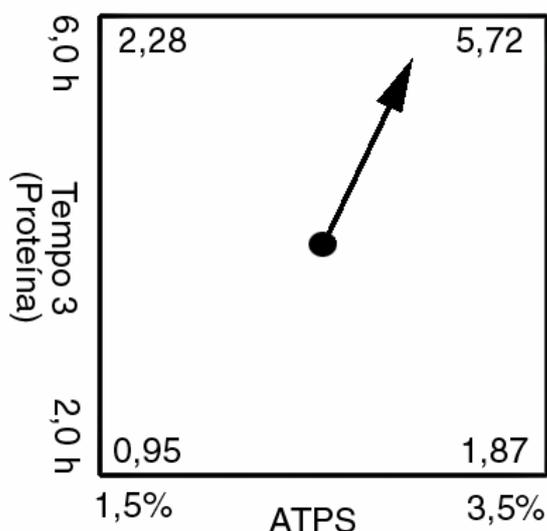


Figura 3.7. Quantidade de proteína imobilizada (mg de proteína/g de sílica) empregando diferentes concentrações de ATPS (1,5 e 3,5% v/v) e tempos de imobilização da enzima de 2 e 6h.

A Figura 3.8 representa a interação entre a concentração de ATPS e o tempo de imobilização da enzima. A variação do tempo de imobilização de 2 para 6 h proporcionou um aumento da enzima imobilizada de 1,0 para 2,0 mg de proteína/g de sílica para a concentração de 1,5% v/v de ATPS e de 2,0 para 6,0 mg de proteína/g de sílica na concentração de 3,5% v/v de ATPS. Este aumento no desempenho da imobilização, cerca de 3 vezes maior, quando realizados com 6 h de imobilização, comprova a interação destas duas variáveis, indicando que para um maior desempenho a concentração de ATPS e o tempo de contato devem variar conjuntamente.

Definidas as variáveis mais significativas, concentração de ATPS e tempo de imobilização da enzima no suporte, realizou-se um planejamento experimental de superfície de resposta para determinar qual o máximo desempenho de imobilização. Para isso foi realizada uma extrapolação da faixa de trabalho baseado nos resultados anteriores e, assumindo que o máximo se encontraria entre as concentrações 2,5 e 4,5% v/v de ATPS e um tempo de 6 a 24 h.

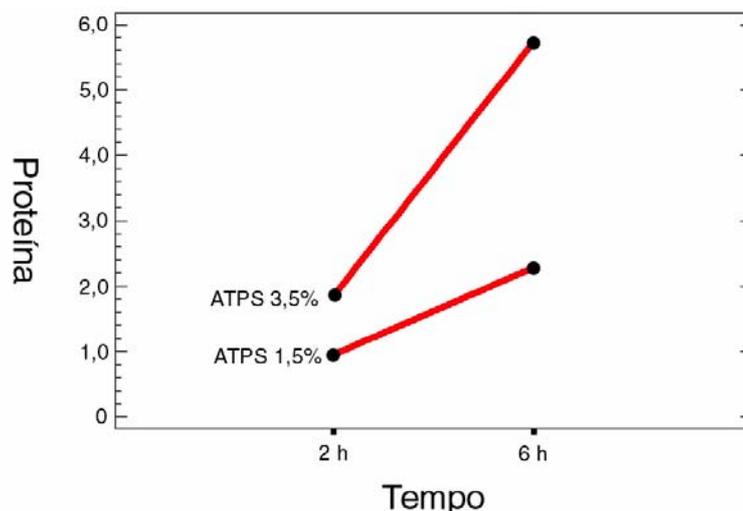


Figura 3.8- Representação da interação entre ATPS e tempo de contato da proteína.

A superfície de resposta obtida a partir dos resultados experimentais, Figura 3.9, é um modelo matemático em que se pode fazer projeções de valores experimentais a partir de dados teóricos. A representatividade desse modelo, calculado a partir dos erros estatísticos, possui correlação de $90 \pm 6 \%$. Essa boa correlação permite que projeções teóricas sejam realizadas nesse intervalo de trabalho e assegurem a consistência dos resultados.

O máximo de desempenho de imobilização foi obtido com a utilização de 4,5% v/v de ATPS e 24 h de tempo de imobilização, porém pode-se observar que não foi obtido um patamar de máximo e que existe uma tendência de aumento da imobilização com o emprego de maiores tempos de imobilização. Apesar da possibilidade de se obter uma maior quantidade de proteína, maior que 8,0 mg de proteína/g de sílica (quantidade máxima obtida na imobilização), não se sabe de uma forma efetiva qual o efeito do procedimento de imobilização sobre a atividade da enzima no suporte. Além disso, as enzimas imobilizadas, pela propriedade proteica e condições de uso, tem a natural tendência de perder seu poder catalítico com o tempo, ficando evidente a necessidade da substituição do reator enzimático do sistema analítico. Assim, é importante estabelecer uma relação de custo e benefício, além de um prévio conhecimento de características químicas do procedimento analítico, como a linearidade da resposta e o limite de detecção desejável, tipo de detecção que será empregada e a matriz na qual será determinado o analito de interesse. A enzima a ser imobilizada, tanto a sua

concentração, como o poder catalítico destas variam muito e devem também ser investigados.

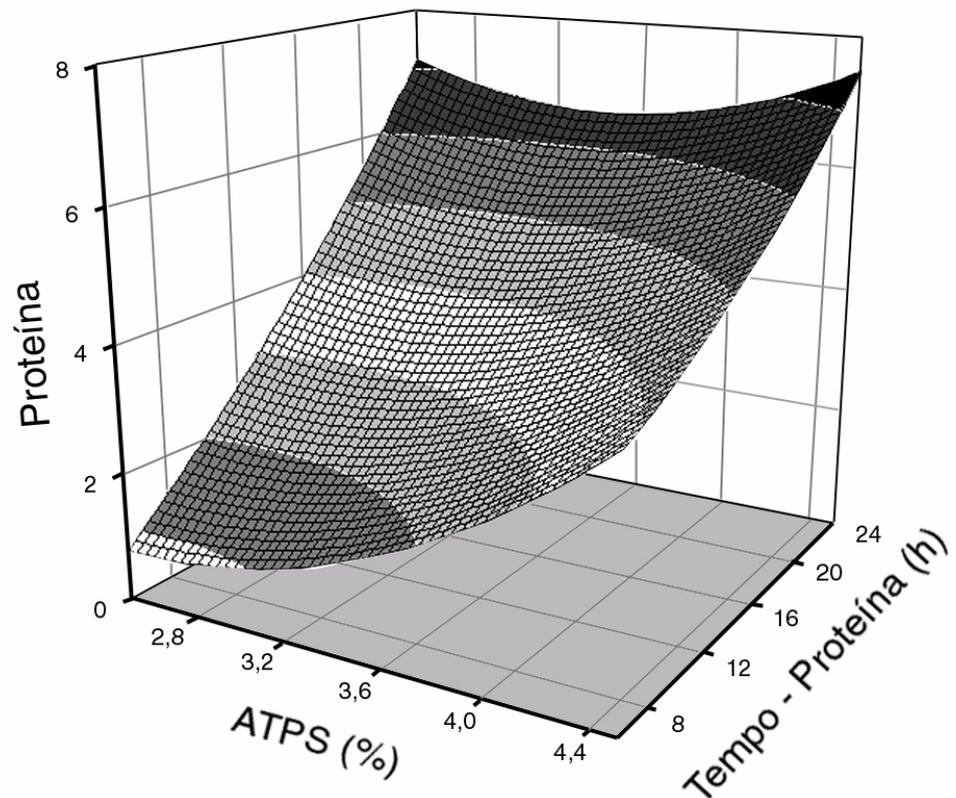


Figura 3.9. Modelo matemático da imobilização da proteína em diferentes concentrações de ATPS e tempos de imobilização.

Assim, nas condições experimentais desse trabalho, se estabeleceu o seguinte protocolo para a imobilização de enzimas:

- Etapa 1- Concentração de ATPS 3,5% v/v e tempo de silanização de 40 min.
- Etapa 2 – Concentração de glutaraldeído 2,5% v/v e tempo de ativação de 40 min.
- Etapa 3 – Tempo de imobilização de 24 h e quantidade de enzima imobilizada por grama de suporte em torno de 8,00 mg de proteína.

3.3.2 - Determinação de glicose em mel, soro glicosado e suco de uva e tomate.

O módulo de análise empregando o conceito de comutação e detecção por quimiluminescência, apresentado na Figura 3.2, permitiu a determinação de glicose em amostras de mel, sucos e soro. O sistema de detecção empregado, fotodiodo de silício e cela de fluxo de polietileno, foi descrito com mais detalhes capítulo 2, item 2.2.2.

As concentrações dos reagentes quimiluminescentes, empregados nestes procedimentos foram de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ para o luminol e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para o hexacianoferrato(III) de potássio, por apresentarem praticamente o mesmo perfil de resposta apresentado nos itens 2.4.5.1 e 2. 4.5.2.

Inicialmente, avaliou-se o efeito do volume da solução de amostra a ser inserido no percurso analítico, variando-se o tempo de acionamento das válvulas V_1+V_2 em 2; 3; 4; 5 e 6 s. A vazão da solução de amostra e/ou padrões foi fixada em $3,0 \text{ mL L}^{-1}$. Os diferentes tempos de acionamento das válvulas, implicam na inserção de alíquotas de amostra e/ou padrões de glicose de 100; 150; 200; 250 e 300 μL respectivamente. O gráfico da Figura 3.10 apresenta o perfil dos resultados obtidos neste estudo. Um aumento da magnitude de sinal ocorre em função do aumento do volume de solução de glicose de 100 para 200 μL , respectivamente. Volumes de solução de glicose, superiores a 200 μL não apresentam efeito significativo sobre a intensidade do sinal analítico. Portanto, fixou-se o tempo de acionamento das válvulas solenóides (V_1 e V_2) em 4 s, correspondendo à inserção de 200 μL de solução de glicose no percurso analítico.

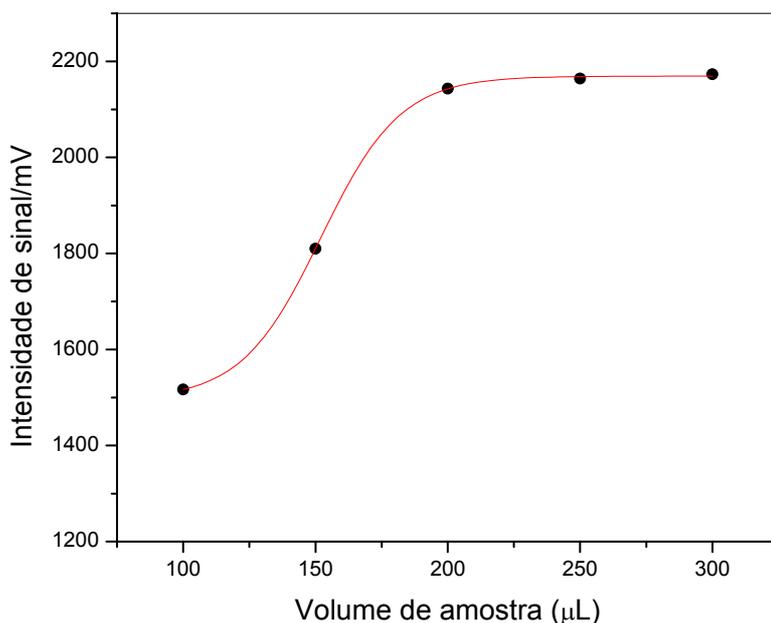


Figura 3.10 – Efeito do volume da amostra inserida no percurso analítico, sobre a magnitude do sinal. (V_1) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato pH 7,0 na vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; (V_2) $9,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de solução de glicose na vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$; (V_3 e V_4) $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de solução de luminol e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{acionam.}} 10 \text{ s}$).

Posteriormente, avaliou-se a influência do volume dos reagentes luminol e hexacianoferrato(III) de potássio sobre a magnitude do sinal analítico. Os volumes destes reagentes foram avaliados, variando-se o tempo de acionamento das válvulas em 5, 7, 8 e 10 s. As vazões das soluções foram mantidas em $3,0 \text{ mL min}^{-1}$. Assim, os volumes das soluções de reagentes inseridos no percurso foram de aproximadamente 250, 350, 400 e $500 \mu\text{L}$, respectivamente. A Figura 3.11 apresenta o perfil dos resultados obtidos sobre a magnitude do sinal analítico (mV) em função da variação do volume de luminol e hexacianoferrato(III) de potássio.

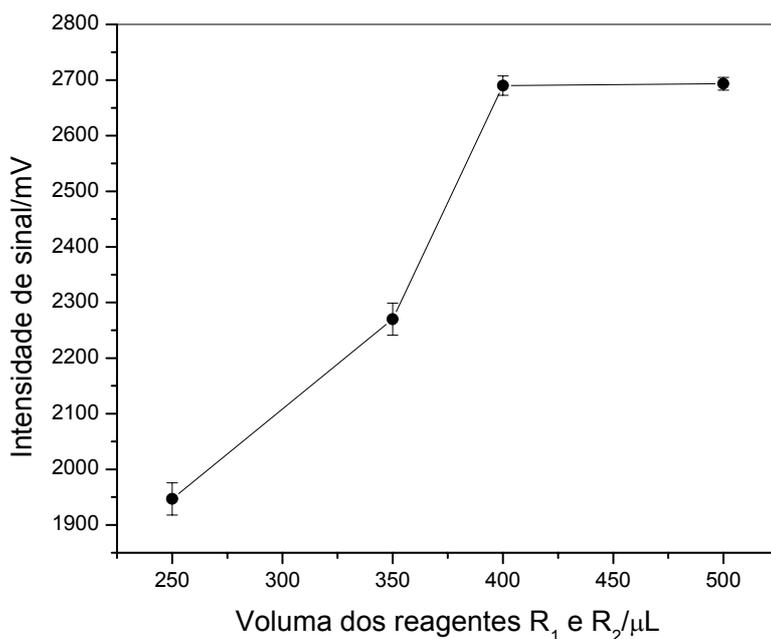


Figura 3.11 – Efeito do volume dos reagentes R_1 (luminol) e R_2 (hexacianoferrato (III) de potássio) inseridos no percurso analítico, sobre a magnitude do sinal. (V_1) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato pH 7,0 na vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; (V_2) $9,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ da solução de glicose, ($t_{\text{acionam.}}$ 4 s), na vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$; (V_3 e V_4) $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de solução de luminol e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$

Um aumento significativo do sinal analítico é observado, quando os volumes dos reagentes passam de ca. 250 para 400 μL . Acima de ca 400 μL , (ou 8 s de acionamento das válvulas V_3 e V_4), um incremento no volume não causa um incremento na magnitude do sinal analítico. Sendo assim estabeleceu-se um tempo de acionamento dos solenóides em 8 s, correspondendo a volumes de cada reagente (luminol e hexacianoferrato(III) de potássio) de ca. 400 μL . Ademais, considerando-se as concentrações dos reagentes, o consumo de luminol e hexacianoferrato (III) de potássio por determinação foi estimado em ca 178,0 μg e 1,32 mg, respectivamente.

Vários parâmetros físico-químicos podem afetar a eficiência da catálise enzimática. Entre eles, destaca-se o efeito do potencial hidrogeniônico (pH) do meio reacional⁴³. Em geral, as enzimas apresentam um pH ótimo de reação. Assim, avaliou-se o efeito do pH da solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ entre 5,5 a 8,0 sobre a magnitude do sinal analítico. A Figura 3.12, apresenta o perfil dos resultados obtidos. Nestes estudos, observou-se que os maiores sinais analíticos foram obtidos nos pHs 7,0 e 7,5. Acima e abaixo desta faixa de pH, ocorreu uma diminuição do sinal analítico. Embora no pH 7,5 o sinal tenha sido ligeiramente maior, escolheu-se o pH 7,0, para os estudos futuros, uma vez que trabalhos da literatura, relatam uma maior estabilidade da enzima entre os pHs 6,0 a 7,0.

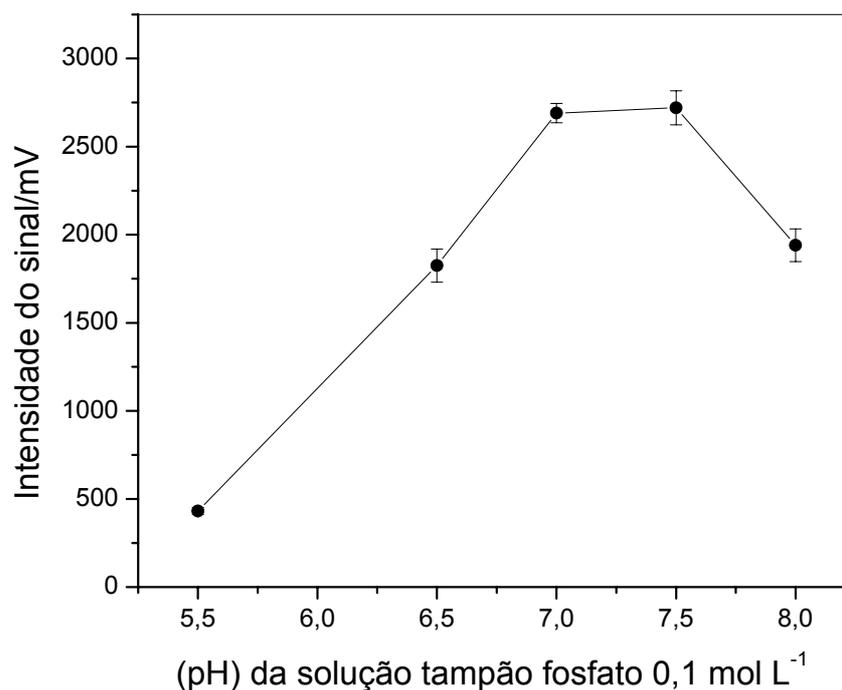


Figura 3.12 – Efeito do pH da solução transportadora sobre o sinal analítico. (V_1) 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato (pH 5,5 – 8,0) na vazão de 2,0 mL min⁻¹; (V_2) $9,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de solução de glicose na vazão de 3,0 mL min⁻¹ ($t_{acionam.}$ 4 s); (V_3 e V_4) 2,5 mmol L⁻¹ de solução de luminol e 10,0 mmol L⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min⁻¹ ($t_{acionam.}$ 8 s).

O efeito da concentração iônica da solução tampão fosfato também foi avaliado nas concentrações de 0,025 a 0,1 mol L⁻¹. Verificou-se que, nas condições de estudo pré-estabelecidas, a concentração da solução tampão fosfato 25 mmol L⁻¹ possui a mesma eficiência, que a solução tampão de concentração de 0,1 mol L⁻¹, sendo então a concentração de 25 mmol L⁻¹ selecionada.

A Tabela 3.3 apresenta um resumo dos estudos de otimização do procedimento em fluxo contendo um reator enzimático, com glicose oxidase imobilizada, para a determinação de glicose em mel, suco de uva, tomate e soro glicosado por quimiluminescência.

TABELA 3.3 – Parâmetros estudados na otimização do sistema em fluxo com o reator contendo glicose oxidase imobilizada

Parâmetro	Faixa estudada	Valor selecionado
Volume da solução de amostra (μ)	100 a 300	200
Volume dos reagentes R ₁ e R ₂ (μ L)	250 a 500	400
pH do carregador	5,5 a 8,0	7,0

Depois de estabelecidas as variáveis relevantes, o procedimento analítico apresentou resposta linear para soluções de referencia de glicose no intervalo de concentração de 5,0 a 160,0 mg L⁻¹ ($2,78 \times 10^{-5}$ a $8,89 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). A Figura 3.13 apresenta a curva analítica obtida, descrita pela equação: Intensidade (mV) = $73,60 + 18,41 \times [\text{glicose}]$ (mg L⁻¹), $r = 0,9999$. O limite de detecção foi estimado em 0,4 mg L⁻¹. Os sinais transientes das medidas em triplicata são apresentados na Figura 3.14. Empregando uma solução correspondendo a 130,0 mg L⁻¹ de glicose, foram realizadas 10 medidas sucessivas para se verificar a repetibilidade da resposta do sistema (Figura 3.15). O coeficiente de variação para 10 medidas (desvio padrão relativo) foi estimado em 1,6 %, indicando assim boa repetibilidade dos sinais transientes.

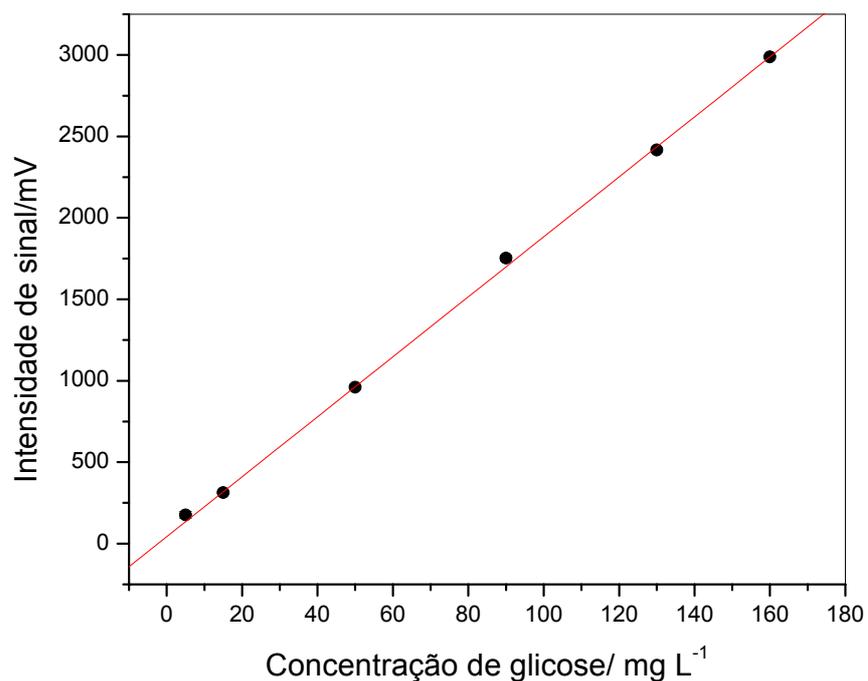


Figura 3.13 - Curva analítica obtida para as soluções de glicose entre 5,0 a 160 mg L⁻¹. V₁) 25,0 mmol L⁻¹ de solução tampão fosfato (pH 7,0 na vazão de 2,0 mL min⁻¹; (V₂) soluções padrões de glicose na vazão de 3,0 mL min⁻¹ (t_{acionam.} 4 s); (V₃ e V₄) 2,5 mmol L⁻¹ de solução de luminol e 10,0 mmol L⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min⁻¹ (t_{acionam.} 8 s).

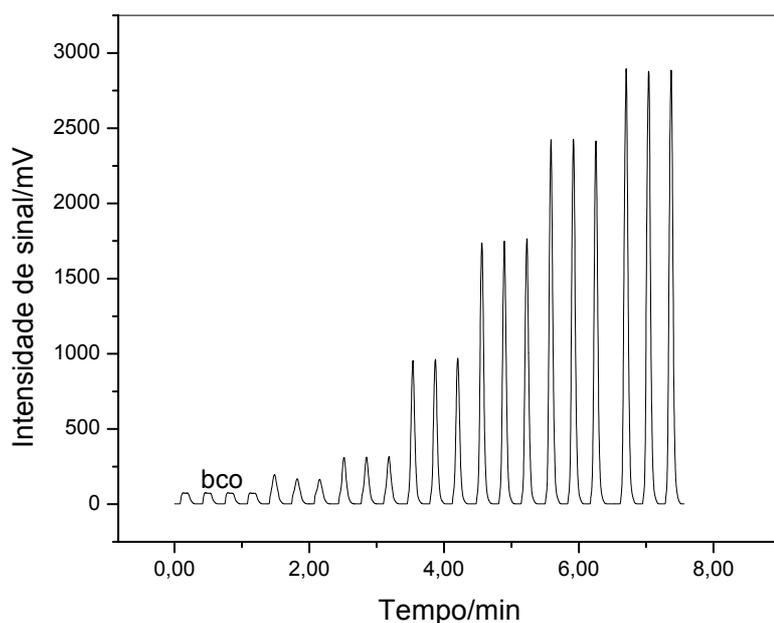


Figura 3.14 – Sinais transientes obtidos com as soluções padrões de glicose de 5,0 a 160 mg L⁻¹. (V₁) 25,0 mmol L⁻¹ de solução tampão fosfato (pH 7,0 na vazão de 2,0 mL min⁻¹); (V₂) soluções padrões de glicose na vazão de 3,0 mL min⁻¹ (t_{acionam.} 4 s); (V₃ e V₄) 2,5 mmol L⁻¹ de solução de luminol e 10,0 mmol L⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min⁻¹ (t_{acionam.} 8 s).

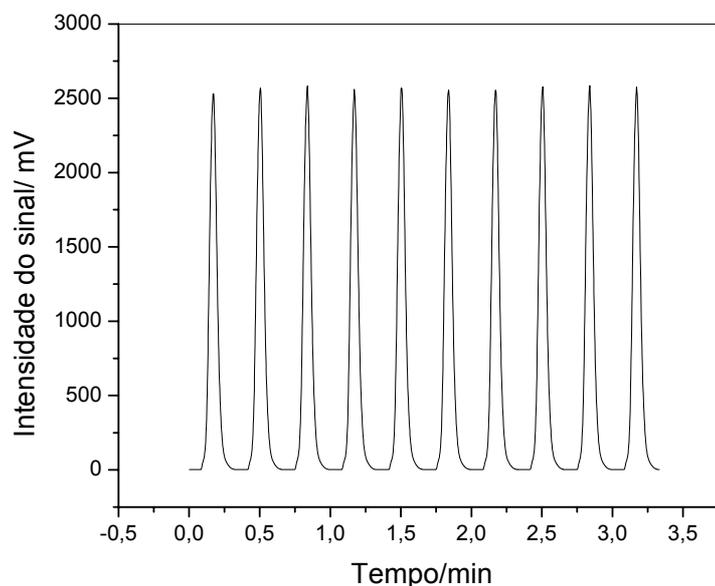


Figura 3.15 – Sinais transientes obtidos para uma solução de glicose 130 mg L⁻¹ empregando o módulo de análises em fluxo com detecção por quimiluminescência

Depois de descritas as figuras de mérito do procedimento, este foi empregado na análise de amostras de mel, soro glicosado, suco de uva e suco de tomate. Inicialmente, foi realizado um estudo de recuperação de glicose nestas amostras. Nestes estudos, duas concentrações diferentes de glicose (10,0 e 80 mg L⁻¹) foram adicionadas nas amostras de mel, xarope de glicose, soro glicosado, suco de uva e de tomate, e os resultados obtidos (foram descontados originalmente daqueles presentes na amostra sem a adição do analito) foram comparados com as concentrações adicionadas. Os resultados das recuperações obtidas são mostrados na Tabela 3.4.

TABELA 3.4– Estudo de adição e recuperação de glicose em amostras de mel, suco de uva e tomate

Amostras	Adicionado mg L⁻¹	Recuperado mg L⁻¹	% Recuperação
Mel	10,0	9,32	93,2
	80,0	72,3	90,4
Xarope de glicose	10,0	9,6	96,0
	80,0	75,4	94,2
Soro glicosado	10,0	9,80	98,0
	80,0	83,1	104,0
Suco de tomate	10,0	8,42	84,2
	80,0	71,9	89,9
Suco de uva	10,0	8,23	82,3
	80,0	69,8	87,2

Analisando-se os resultados obtidos, verifica-se que dentre as matrizes analisadas, as do suco de uva e tomate, apresentaram recuperações abaixo de 90%. Como a matriz possui várias substâncias, algumas podem interferir no procedimento proposto, como é o caso do ácido ascórbico, devido ao seu poder redutor, esse poderia estar inibindo a reação enzimática e/ou consumindo o oxidante da reação quimiluminescente, diminuindo assim a luminescência.

Portanto, a determinação da concentração de glicose, em mel, xarope de glicose e soro glicosado foi realizada diretamente, empregando a curva analítica. A determinação de glicose nos sucos foi realizada pelo método de adição múltipla de padrões a fim de se minimizar o efeito de matriz.⁶³

A Tabela 3.5, apresenta os resultados obtidos da determinação de glicose nestas amostras empregando-se o procedimento proposto e o método comparativo(Kit enzimático).⁶²

TABELA 3.5 - Determinação do teor de glicose em amostras de mel, karo, soro glicosado, suco de uva e de tomate pelo método proposto e pelo método comparativo

Amostras	<u>Comparativo</u>		<u>Proposto</u>
	mg mL ⁻¹		Er (%)
Mel	272 ± 11	263 ± 11	- 3,3
Xarope de glicose	281 ± 7	270 ± 10	-3,9
Soro glicosado	49,5 ± 0,8	50,3 ± 0,9	1,6
Suco de uva (A)*	70,4 ± 0,7	73,5 ± 0,9	4,4
Suco de uva (B)*	74,3 ± 0,4	74,0 ± 0,7	-0,4
Suco de tomate (A)*	10,4 ± 0,6	11,2 ± 0,6	7,6
Suco de tomate (B)*	10,8 ± 0,4	11,8 ± 0,5	9,2

n = 3

* determinação por adição múltipla de padrão

As Figuras 3.16 e 3.17 apresentam os sinais transientes obtidos e a curva de adição múltipla de padrões para a glicose em amostras de suco de tomate e uva, respectivamente.

Com o procedimento empregado, foi possível obter uma frequência de amostragem de 140 determinações por hora e um baixo consumo de reagentes, gastando-se em torno de 178,0 µg de luminol e 1,32 mg de hexacianoferrato(III) de potássio por determinação de glicose.

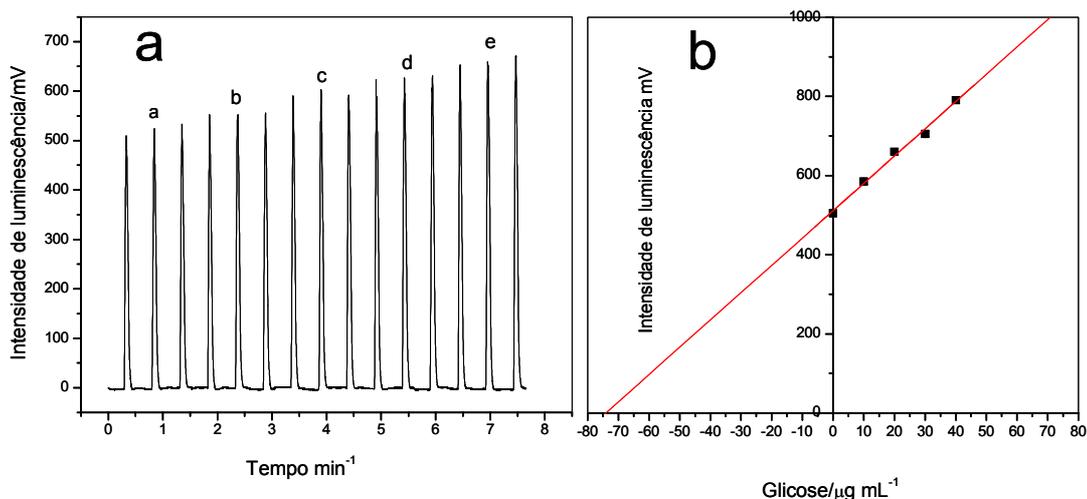


Figura 3.16 – (a) Sinais transientes em triplicata obtidos na análise do suco de uva por adição de padrão, (b) curva analítica da adição de padrão para determinação de glicose em suco de uva.

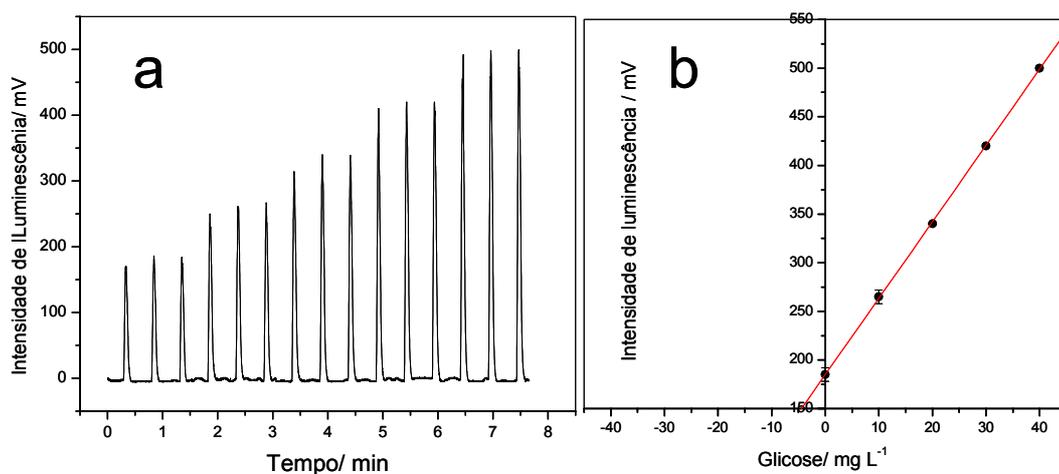


Figura 3.17 – (a) Sinais transientes em triplicata obtidos na análise do suco de tomate por adição de padrão, (b) curva analítica da adição de padrão para determinação de glicose em suco de tomate

3.3.3 - Determinação de glicose em plasma sanguíneo

Foram realizadas também as determinações de glicose em plasma sanguíneo, empregando-se o procedimento em fluxo com detecção por quimiluminescência. Níveis elevados de glicose no sangue, estão associados com diabetes mellitus, hiperatividade da glândula tireóide, pituitária ou adrenal. Níveis

baixos são observados em caso de “overdose” de insulina, tumores secretores de insulina, hipoadrenismo e condições que interferem com a absorção de glicose. Normalmente, a concentração de glicose encontrada no plasma sanguíneo de pessoas adultas⁶⁴, após 12h de jejum, varia de 70 a 110 mg dL⁻¹. Com base nestes dados, foram realizadas algumas alterações na configuração do módulo de análise empregado anteriormente para a determinação de glicose em sucos e mel. A reconfiguração do módulo de análise foi realizada a fim de se minimizar o máximo possível a manipulação da amostra, bem como as diluições necessárias. O emprego de um menor volume de amostra se faz necessário, uma vez que em geral são disponibilizados 2,0 mL de plasma para a análise de glicose. A linearidade da curva analítica deve contemplar o intervalo de concentração esperado de glicose para pessoas consideradas saudáveis. Portanto, no módulo de análise proposto, Figura 3.3, foi utilizada uma alça de amostragem de 25 µL e uma bobina de dispersão de 100 cm (B₁). O descarte das soluções, foram realizados em um frasco contendo solução de hipoclorito de sódio 5% v/v.

Com a mudança do módulo de análise (alça de amostragem e bobina de mistura/diluição) foi realizado um estudo, a fim de se estabelecer qual seria o tempo ideal para o acionamento das válvulas V₄ e V₅ (solução de luminol e hexacianoferrato(III) de potássio), após a inserção do “plug” das soluções padrões e/ou amostra no percurso analítico. A Figura 3.18 apresenta os resultados obtidos nestes estudos.

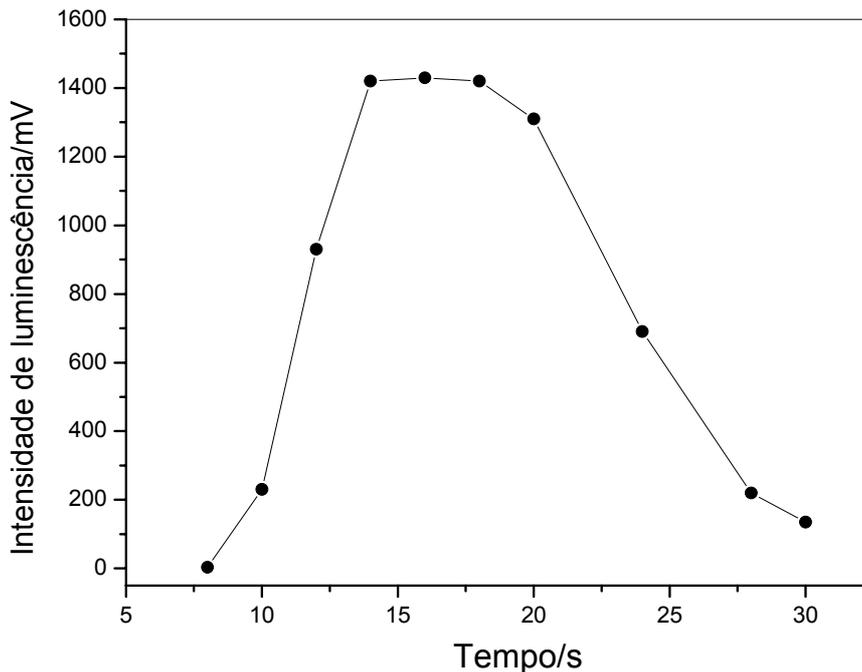


Figura 3.18 - Efeito do tempo de “delay” para o acionamento das válvulas (V_4 e V_5) após a introdução da amostra no percurso analítico. Alça de amostragem L_1 de $25,0 \mu\text{L}$; Carregador: $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato (pH 7,0 na vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; (V_4 e V_5) $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de solução de luminol e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{acionam.}} 8 \text{ s}$).

Analisando-se o perfil do gráfico obtido, verifica-se o gradiente de concentração da solução de peróxido de hidrogênio, gerado, pela dispersão no percurso analítico. Cabe ressaltar que, após o tempo de “delay”, as válvulas de luminol e catalisador foram acionadas durante 8 s. Entre o tempo de 8 a 14 s, verifica-se um aumento do sinal analítico, atingindo um máximo de sinal entre 14 a 19 s e tempos superiores a 19 s, houve queda do sinal analítico. Considerando-se a dispersão do peróxido de hidrogênio no sistema em fluxo, a partir do ponto de confluência (y), verifica-se que entre 8 a 10 s o início da zona de amostra “no caso H_2O_2 ” esta passando pelo ponto Y, entre 14 a 19 s, o centro da zona de amostra, no qual tem-se maior concentração de H_2O_2 está passando pelo ponto y. Portanto, fixou-se o tempo de delay em 16 s, no procedimento para a determinação de glicose em plasma sanguíneo.

Outro estudo realizado foi a variação do tempo de acionamento das válvulas V_4 e V_5 que correspondem a diferentes volumes de reagentes, (100 a 400 μL) de luminol e hexacianoferrato (III) de potássio no percurso analítico. A Figura 3.19, apresenta os resultados obtidos, variando-se o tempo de acionamento das válvulas V_4 e V_5 .

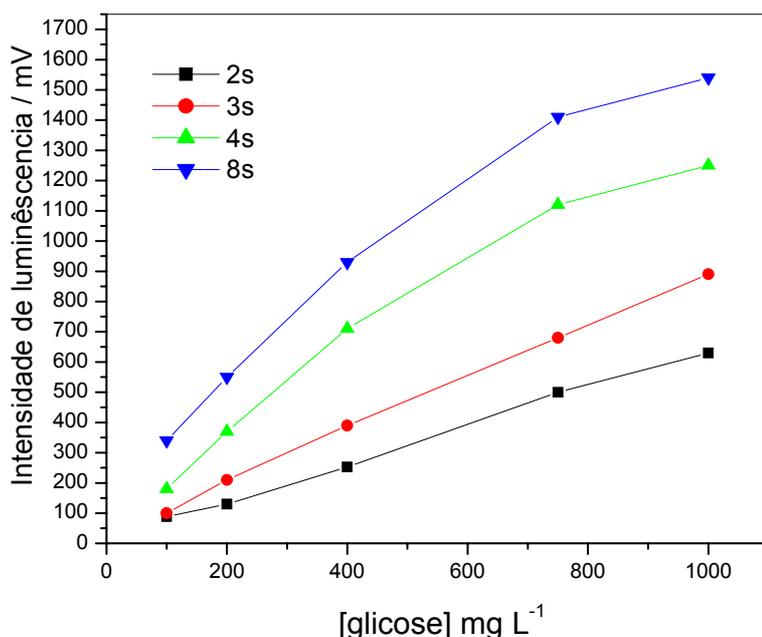


Figura 3.19 - Intensidade do sinal analítico em função do tempo de acionamento das válvulas V_4 (luminol) e V_5 (hexacianoferrato(III)) para diferentes concentrações de glicose. Alça de amostragem L1 de 25,0 μL ; Carregador: 25,0 mmol L^{-1} de solução tampão fosfato (pH 7,0 na vazão de 2,0 mL min^{-1} ; (V_4 e V_5) 2,5 mmol L^{-1} de solução de luminol e 10,0 mmol L^{-1} da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min^{-1} ($t_{\text{acionam.}}$ 8 s).

Analisando-se as curvas analíticas obtidas para as concentrações de glicose de 100 a 1000 mg L^{-1} , em função da variação dos tempos de acionamento, das válvulas solenóides (V_4 e V_5) de 2 a 8 s, referentes as soluções de luminol e hexacianoferrato(III) de potássio, (Figura 3.19) verificou-se um aumento da sensibilidade, quando o tempo de acionamento das válvulas variou de 2 a 8 s, (100 a 400 μL). Por outro lado, observa-se uma tendência de diminuição da linearidade da curva analítica para aquelas curvas obtidas com maior volume de reagentes, ou seja, maiores tempos de acionamento das

válvulas solenóides. Sendo assim, selecionou-se um tempo de acionamento das válvulas solenóides de 3 s para a determinação de glicose em plasma sanguíneo.

Estabelecidas algumas variáveis relevantes do módulo de análise, a curva analítica apresentou uma resposta linear para concentrações de glicose de 100 a 1000 mg L⁻¹ (10 a 100 mg dL⁻¹). A Figura 3.20 apresenta a curva analítica obtida, descrita pela equação Intensidade (mV) = 41,2 + 8,10 x [glicose] (mg L⁻¹), r = 0,998. Os sinais transientes das medidas em triplicata são apresentados na Figura 3.21. Empregando-se uma solução de glicose 600,0 mg L⁻¹ foram realizadas 10 medidas sucessivas no estudo da repetibilidade do procedimento. O coeficiente de variação para 10 medidas (desvio padrão relativo) foi estimado em 1,8%. A frequência de amostragem foi estimada em 70 determinações por hora, e o consumo dos reagentes luminol e hexacianoferrato (III) de potássio por determinação foi estimado em 66,4 µg e 494,0 µg, respectivamente.

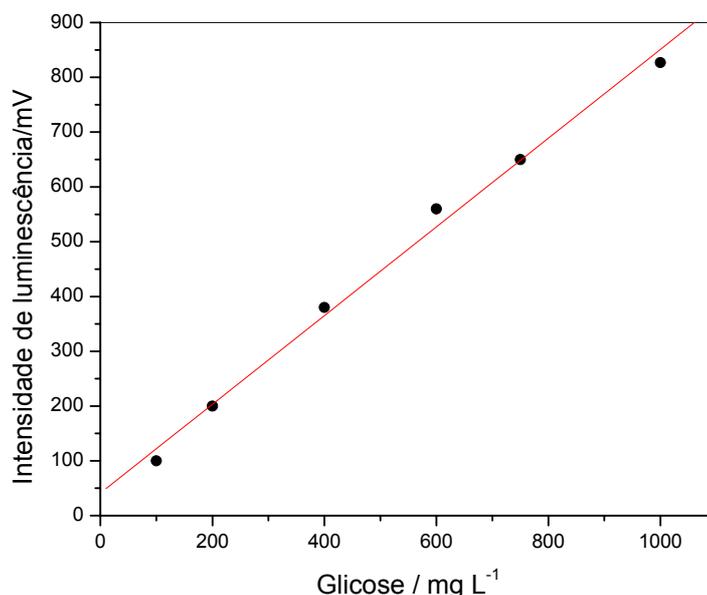


Figura 3.20 - Curva analítica obtida para soluções de glicose entre 100,0 a 1000 mg L⁻¹. Carregador: 25,0 mmol L⁻¹ de solução tampão fosfato (pH 7,0 na vazão de 2,0 mL min⁻¹; (L₁) alça de amostragem de 25,0 µL; (V₃ e V₄) 2,5 mmol L⁻¹ de solução de luminol e 10,0 mmol L⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min⁻¹ (t_{acionam.} 3s).

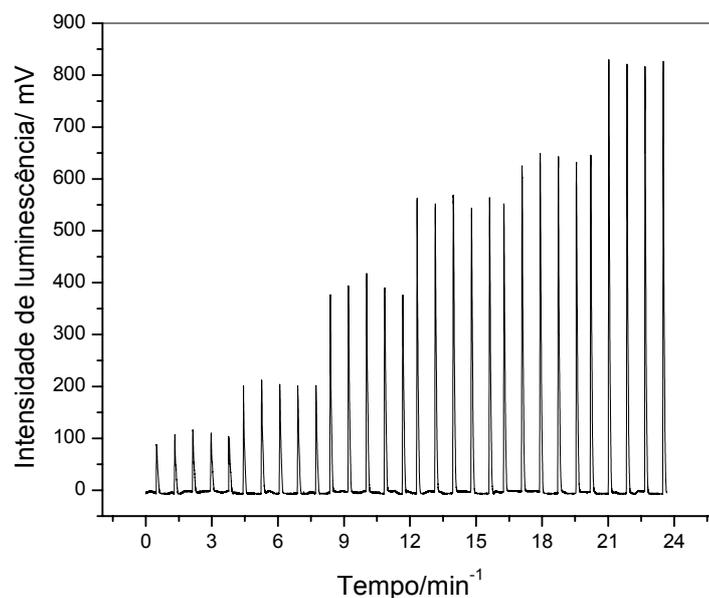


Figura 3.21 – (a) Sinais transientes em quintuplicata obtidas para os padrões de glicose de 100 a 1000 mg L⁻¹.

3.3.3.1. Estudo de adição e recuperação de glicose em plasma

Nos testes de adição e recuperação, três concentrações diferentes de glicose (200, 350,0 e 600,0 mg L⁻¹) foram adicionadas nas amostras de plasma sanguíneo. Estas amostras foram cedidas pelo Laboratório de Análises Clínicas Maricondi, da cidade de São Carlos. Os resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação são apresentados na Tabela 3.6.

TABELA 3.6 – Estudo de adição e recuperação de glicose em amostras de plasma sanguíneo.

Amostras	Adicionado mg dL⁻¹	Recuperado mg dL⁻¹	% Recuperação
Amostra 1	20,0	20,3 ± 0,5	102
	35,0	36,8 ± 0,9	105
	60,0	60,9 ± 0,6	102
Amostra 2	20,0	18,9 ± 0,8	94,7
	35,0	36,8 ± 0,7	105
	60,0	58,1 ± 0,5	96,9
Amostra 3	20,0	20,8 ± 0,4	98
	35,0	35,4 ± 0,9	104
	60,0	59,7 ± 0,6	99,6

n=3

As recuperações de glicose nestas amostras analisadas variaram de 94,7 a 105,3 %. Esses resultados indicam de efeitos de matriz, nas determinações dos teores de glicose. Sendo assim, os teores de glicose no plasma sanguíneo foram determinados empregado-se uma curva analítica obtida com soluções de referência deste analito. A Tabela 3.7, apresenta os resultados obtidos na determinação de glicose em plasma sanguíneo, empregando-se o método proposto e o método comparativo⁶².

TABELA 3.7 - Determinação do teor de glicose em amostras de plasma sanguíneo pelo método proposto e pelo método comparativo

Amostras	Comparativo (Kit)⁶²	Proposto	Er (%)
	mg dL⁻¹		
Amostra 1	61 ± 3	59 ± 4	- 3,2
Amostra 2	47 ± 5	46 ± 9	- 2,1
Amostra 3	68 ± 6	68 ± 8	0
Amostra 4	115 ± 8	117 ± 9	+1,7

n = 3

4.0 - Conclusões

O sistema de análises em fluxo proposto para a determinação de glicose em mel, sucos e soro glicosado mostrou-se adequado para a quantificação deste analito nas amostras. A quantificação de glicose no suco de uva e tomate foi possível, empregando-se o procedimento de adição de padrão. A imobilização da glicose oxidase em esferas de sílica de porosidade controlada (CPG) apresentou uma excelente estabilidade, apresentando alta atividade por mais de 4 meses com uso freqüente. Empregando o conceito de multicomutação, foi possível ajustar e adequar o procedimento analítico para a determinação de glicose em plasma sanguíneo com poucas modificações. Os resultados obtidos neste procedimento foram concordantes com o método comparativo (kit-enzimático).

CAPÍTULO 4

PROCEDIMENTO ANALÍTICO EM FLUXO COM DETECÇÃO QUIMILUMINESCENTE PARA A DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS E BIOQUÍMICAS

4 Apresentação

Neste Capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica sobre os procedimentos analíticos para a determinação de colesterol. Na seqüência serão apresentados os procedimentos analíticos em fluxo desenvolvidos para a determinação de colesterol em amostras de ovos e plasma sanguíneo.

4.1 Revisão Bibliográfica

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para a determinação de colesterol em diversos tipos de amostras, como sangue e alimentos. Os principais métodos analíticos para análise de colesterol podem ser divididos em três grupos: espectrofotométricos, enzimáticos e cromatográficos. O procedimento espectrofotométrico é o mais barato e tem sido o mais utilizado, contudo, muito se discute sobre a falta de seletividade do método. O método enzimático é considerado menos oneroso e o mais seletivo. Os métodos cromatográficos são considerados mais caros e mais laboriosos.

ALLAIN *et al.*⁶⁵ desenvolveram um procedimento baseado em reações enzimáticas, envolvendo três enzimas, para a determinação de colesterol total em soro. A curva analítica foi linear até 600 mg dL⁻¹ necessitando, entretanto, do tratamento das amostras. O éster do colesterol foi hidrolisado a colesterol livre pela colesterol esterase. O colesterol livre produzido foi oxidado pela colesterol oxidase a colestenoína com a produção simultânea do peróxido de hidrogênio, o qual oxidava a 4-aminoantipirina e fenol na presença da peroxidase, formando um produto com absorção máxima em 500 nm. O método foi reprodutível e apresentou boa precisão.

HUANG *et al.*⁶⁶ desenvolveram um biossensor quimiluminescente adaptado em um sistema de análises por injeção em fluxo para a determinação de colesterol em soro humano. A enzima colesterol oxidase foi imobilizada em sílica gel amino-modificada, via ativação com glutaraldeído, e acondicionada numa coluna. Os reagentes analíticos, incluindo o luminol e o ferricianeto, foram eletrostaticamente imobilizados juntos numa coluna de troca aniônica. O colesterol foi detectado por quimiluminescência através do peróxido de hidrogênio

gerado. A curva analítica apresentou resposta linear entre 5×10^{-6} e 1×10^{-4} g mL⁻¹ de colesterol e o limite de detecção foi estimado em 5×10^{-6} g mL⁻¹.

Um método para a determinação enzimática de colesterol total em soro humano foi desenvolvido por HAHN e OLSON⁶⁷. Para isso, os autores utilizaram as enzimas colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase. O peróxido de hidrogênio produzido era monitorado amperométricamente. O método mostrou boa reprodutibilidade, precisão e sensibilidade.

A combinação do uso de colesterol esterase e colesterol oxidase para a determinação de colesterol em soro foi estudada por TABATA *et al*⁶⁸. As enzimas comerciais, colesterol esterase e oxidase, foram imobilizadas simultaneamente em esferas de vidro, as quais foram acondicionadas numa coluna de 1,5 x 40 mm e integrada em um sistema de análises em fluxo de um *Auto-Analyser I*. O peróxido de hidrogênio produzido pela enzima oxidase foi determinado colorimetricamente. De acordo com os resultados obtidos, a co-imobilização das enzimas na coluna se mostrou mais eficiente quando comparada com a coluna enzimática que continha a mistura das duas enzimas imobilizadas individualmente.

YAO e WASA⁶⁹ propuseram um sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de colesterol total e colesterol livre. Nesse caso, a alíquota da amostra foi dividida em duas partes. Para determinação de colesterol total, parte da amostra foi transportada para as colunas no qual estavam imobilizadas as enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase. Para a determinação do colesterol livre, a outra parte da amostra foi transportada para a coluna que continha apenas a colesterol oxidase. A frequência de amostragem foi de 10 determinações por hora, com desvio padrão relativo < 2%.

KRUG *et al*.⁷⁰ propuseram a determinação de colesterol total em soro humano empregando detecção fotométrica em um sistema de análises por injeção em fluxo. O volume de amostra injetado foi de 70 µL, o qual passou através dos reatores enzimáticos que continham a colesterol esterase e colesterol oxidase, imobilizadas em esferas de vidro. O peróxido de hidrogênio liberado na reação enzimática foi complexado com 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) reação catalisada pela peroxidase. A curva analítica foi linear para a

faixa de 0,11 a 8,6 mmol L⁻¹, e a exatidão do método foi comparada com o resultado obtido com o método espectrofotométrico (kit enzimático).

SASAMOTO *et al.*⁷¹ desenvolveram um método enzimático com detecção quimiluminescente para determinação de colesterol em soro. A quimiluminescência foi gerada pela reação de lucigenina e peróxido de hidrogênio. O último foi produzido na reação catalisada pela colesterol oxidase. O limite de detecção para o colesterol foi de 1,0 mg L⁻¹, e o coeficiente de variação se situou entre 2,3 e 4,2%. O coeficiente de correlação linear entre o método proposto e o convencional foi de 0,963.

NABI *et al.*⁷² propuseram um método para a determinação de colesterol em soro sanguíneo. O procedimento foi baseado na medida da emissão quimiluminescente resultante da oxidação do luminol com o peróxido de hidrogênio na presença do catalisador cobalto(II). Limite de detecção de 0,01 mg dL⁻¹ e o desvio padrão relativo < 5% para a faixa de 10 e 60 mg dL⁻¹ foram obtidos. Os resultados foram concordantes com o método espectrofotométrico para a determinação de colesterol em soro.

A determinação de colesterol em soro empregando método potenciométrico por injeção em fluxo com reações enzimáticas envolvendo três enzimas (colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase) e eletrodo de tungstênio foi proposto por SITUMORANG *et al.*⁷³ A colesterol esterase converte o éster de colesterol a colesterol livre, o qual é oxidado pela colesterol oxidase produzindo o peróxido de hidrogênio. O ferricianeto é convertido a ferrocianeto pelo peróxido de hidrogênio, catalisado pela peroxidase, e o eletrodo de tungstênio responde à razão de ferriicianeto a ferrocianeto. A curva analítica foi obtida com soluções de referência entre 0,05 e 3,0 mmol L⁻¹ de colesterol. O limite de detecção foi 0,01 mmol L⁻¹ de colesterol.

Um método para análise de colesterol total em soro foi desenvolvido por MALIK e PUNDIR⁷⁴ empregando imobilização individual da colesterol esterase e colesterol oxidase e também a co-imobilização das enzimas em esferas de vidro. A peroxidase também foi imobilizada em esferas de vidro. O éster de colesterol foi hidrolisado pela colesterol esterase a ácidos graxos e colesterol, o qual é oxidado pela colesterol oxidase a colesteno e peróxido de hidrogênio. O

peróxido de hidrogênio, juntamente com a peroxidase, oxidou a 4-aminofenazona com fenol, formando o produto quinonaimina, com absorção máxima a 520 nm. As enzimas co-imobilizadas levaram a uma melhora da eficiência em termos de linearidade da curva analítica e precisão quando comparadas com a imobilização individual.

ARAÚJO *et al.*⁷⁵ propuseram um procedimento de análises em fluxo monossegmentando para a determinação de colesterol em plasma sanguíneo por espectrofotometria. As soluções de enzimas (colesterol oxidase, colesterol esterase e peroxidase), reagentes e amostras eram inseridas entre bolhas de ar, no percurso analítico. O peróxido de hidrogênio, liberado na reação enzimática, reagia com 4- aminoantipirina e fenol, catalisado pela enzima peroxidase, formando um complexo colorido monitorado espectrofotometricamente em 546 nm. A curva analítica foi linear para a faixa de 1,29 a 10,35 mmol L⁻¹. O procedimento analítico apresentou uma frequência de amostragem de 42 determinações/hora, e um desvio padrão relativo menor que 3%. Os resultados foram concordantes com o método espectrofotométrico para a determinação de colesterol em soro (kit enzimático).

Um procedimento em fluxo empregando o conceito de multicomutação e detecção quimiluminescente para a determinação de colesterol em soro animal foi proposto por Pires *et al.*⁷⁶ As enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase foram imobilizadas em duas mini colunas (15mm x 5mm) e acopladas no percurso analítico. O peróxido de hidrogênio, produzido na reação enzimática, reagia com luminol e hexacianoferrato(III) de potássio produzindo a quimiluminescência. A curva analítica foi linear no intervalo de 25,0 a 125,0 mg L⁻¹, um limite de detecção de 3,7 mg L⁻¹ e uma frequência de amostragem de 40 determinações/hora foram obtidos. O consumo dos reagentes luminol e hexacianoferricianeto de potássio, foram de 0,22 mg e 2,7 mg, respectivamente.

4.2 Parte Experimental

Para a determinação de colesterol, em ovos e plasma sanguíneo, também foram empregadas enzimas imobilizadas em reatores, sendo que o produto da catálise enzimática, peróxido de hidrogênio, foi monitorado via reação

quimiluminescente, empregando os reagentes luminol e hexacianoferrato(III) de potássio, como catalisador da reação. A intensidade da quimiluminescência era então correlacionada com a concentração de colesterol. No procedimento para a determinação de colesterol em ovos (colesterol livre), foi empregada apenas a enzima colesterol oxidase. Já no procedimento para a determinação de colesterol em plasma sanguíneo, também foi empregada a enzima colesterol esterase. A Figura 4.1 apresenta as reações enzimáticas envolvidas, bem como a reação quimiluminescente empregada para a determinação de colesterol nas amostras.

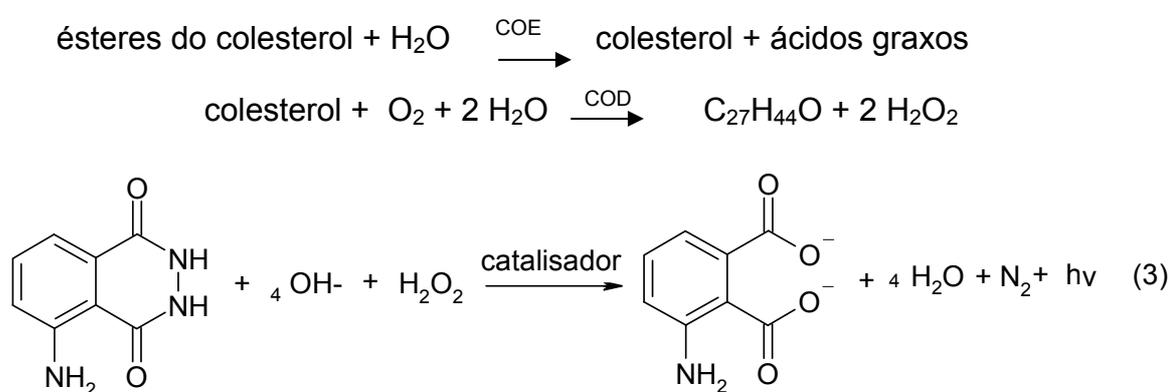


FIGURA 4.1 - Reações para a determinação do colesterol total em amostras de soro sanguíneo.

Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela enzima colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela enzima colesterol oxidase a colesteno e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio reage com o luminol em meio alcalino, pH 10,5, na presença do catalisador hexacianoferrato (III), produzindo quimiluminescência na cor azul.

4.2.1 – Equipamentos e acessórios

Para construção dos módulos de análise foram empregados tubos de polietileno (0,8 mm d.i) e confluências feitas de acrílico. A propulsão dos fluidos foi feita com uma bomba peristáltica Ismatec (IPC-8), equipada com tubos de propulsão de Tygon de diferentes diâmetros. O controle do módulo de análise e aquisição de dados foram realizados, empregando-se um microcomputador

(Pentium 233 MHz), equipado com uma interface eletrônica (Advantec Corp., PCL-711S). A linguagem de programação utilizada foi LabVIEW 6.0. As medidas da radiação quimiluminescente (expressas em mV) foram feitas empregando-se um fotodetector OSD 50-E e uma cela de medida de polietileno como descrito no item 2.3.2 do capítulo 2.

4.2.2 - Reagentes e soluções

4.2.2.1 – Reagentes e soluções empregados na imobilização das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase

As soluções foram preparadas empregando-se água desionizada e reagentes com grau de pureza analítico.

O suporte empregado para a imobilização das enzimas foi a sílica de porosidade controlada com diâmetro de poro de 170 Å (200-400 mesh).

Uma massa de 25 mg (120 U) da enzima colesterol oxidase (Sigma) foi solubilizada em 2,0 mL de solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,5).

Uma massa de 3,0 mg (25 U) da enzima colesterol esterase (Sigma) foi solubilizada em 2,0 mL de solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,5).

Uma solução 4,5% (v/v) 3-aminopropiltriétoxisilano (ATPS) foi preparada em água desionizada a partir de uma solução de 98% deste reagente, proveniente da Sigma.

Uma solução 2,5% (m/v) glutaraldeído foi preparada a partir de uma solução 25 % (m/v) deste reagente, proveniente da Sigma.

Para a determinação de proteínas empregou-se o método proposto por Hartree⁷⁷ como descrito a seguir.

A solução padrão de proteína foi preparada dissolvendo-se 11,4 mg de albumina de soro bovino (Aldrich, lote 9140330) em um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com água destilada. As soluções de referência foram preparadas pelas diluições apropriadas da solução estoque.

Para a preparação do reagente A, 1,0 g de tartarato de sódio e potássio e 50g de carbonato de sódio foram dissolvidos em um béquer contendo aproximadamente 250 mL de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} . A solução foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água desionizada.

O reagente B foi preparado dissolvendo 1,01 g de tartarato de sódio e potássio e 0,52 g de sulfato de cobre pentahidratado em um balão volumétrico de 50 mL contendo 25 mL de água desionizada, sendo o volume final completado com hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} .

Na preparação do reagente C, 3 mL solução de Folin Cicocalteau foram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água destilada.

4.2.2.2 – Reagentes e soluções empregados na otimização do procedimento em fluxo para a determinação de colesterol

Todas as soluções foram preparadas empregando-se água desionizada e reagentes com grau de pureza analítico.

Solução estoque 4000 mg L^{-1} de colesterol foi preparada dissolvendo-se 500 mg de colesterol (Sigma) em uma mistura contendo 12,5 mL de Triton X-100 e 12,5 mL isopropanol. Aqueceu-se a mistura lentamente até $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Após a dissolução, a solução de colesterol foi transferida para um balão de 125,0 mL completado-se o volume com água.

As soluções de referência de 250,0 a $4000,0 \text{ mg L}^{-1}$ de colesterol foram preparadas em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato (pH 7,0), por diluições apropriadas da solução estoque.

A solução estoque de luminol $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 320,0 mg de 5-amino-2,3-diidro-1,4 ftalazinadiona (Sigma) em 200 mL de solução de carbonato de potássio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 11,0). A solução foi preparada 3 dias antes do uso e armazenada em frasco âmbar mantida sob refrigeração. Soluções de trabalho em concentrações variando de 1,0 a $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de luminol foram preparadas por diluição apropriada da solução estoque em solução de carbonato de sódio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução estoque de hexacianoferrato (III) de potássio 50,0 mmol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 4,132 g do sal (Reagen) em 500 mL de água desionizada. Soluções de trabalho em concentrações variando de 5,0 a 50,0 mmol L⁻¹ de hexacianoferrato (III) de potássio foram preparadas pôr diluição apropriada da solução estoque em água desionizada.

As soluções de glicose 1000 mg L⁻¹, uréia 200 mg L⁻¹, ácido úrico 100 mg L⁻¹, ácido ascórbico 10 mg L⁻¹ e dos cátions Cu²⁺ 100 µg L⁻¹, Zn²⁺ 100 µg L⁻¹, K⁺ 100 mg L⁻¹, Na⁺ 1000 mg L⁻¹, Ca²⁺ 90 mg L⁻¹ e Fe²⁺ 5,0 µg L⁻¹, foram preparadas a partir dos seus respectivos sais em solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0).

4.2.2.3 – Preparo das amostras de ovos

Os ovos analisados neste trabalho foram adquiridos em supermercados de São Carlos. Estes ovos (brancos e vermelhos) apresentaram um peso médio de 56 g e um peso médio de gema de 15 g.

Para a análise de colesterol em ovos, duas metodologias de preparo da amostra foram avaliadas. A primeira, consiste na solubilização da gema do ovo em uma solução salina⁷⁸. Neste procedimento, as gemas de ovos (3 por análise), foram separadas da clara. Posteriormente, 1,5 g de gema foram adicionadas em aproximadamente 17 mL de solução de NaCl 2% (m/v) e agitou-se a solução gentilmente, com o auxílio de um agitador magnético, durante 60 min. Posteriormente a solução foi adicionada em um balão volumétrico de 25 mL, completando seu volume com a solução de NaCl 2% (m/v). Diluições apropriadas, 1:25, foram realizadas em solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 7,0 para a análise de colesterol empregando-se o procedimento quimiluminescente proposto.

Um segundo procedimento, muito comum na literatura⁷⁹, consiste na saponificação dos ovos e posterior extração do colesterol com solvente orgânico. Inicialmente, 3 gemas de ovos foram pesadas, homogeneizados e peneirados em uma peneira de aço inox de 40 mesh. Posteriormente, 0,51 g foram pesados e colocados dentro de um balão de fundo chato, juntamente com 5,0 mL de uma solução de hidróxido de potássio 2% (m/v) em etanol. O balão foi acoplado em um sistema de refluxo e aquecido, com o auxílio de uma manta aquecedora, a 50°C

durante 1,0 h. Transcorrido o tempo de aquecimento, separou-se a fração insaponificável por filtração, lavando-se o balão com 25,0 mL de água desionizada e transferiu-se para um funil de separação. Após o resfriamento da solução, o colesterol foi extraído com duas alíquotas de 10 mL de hexano. O extrato orgânico foi separado e lavado com 20 mL de água desionizada, com o auxílio de um funil de separação. Posteriormente, o solvente orgânico foi evaporado a baixa pressão com o auxílio de um evaporador rotativo. O extrato contendo colesterol foi então solubilizado em uma solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ contendo 10 % (v/v) de isopropanol e Triton X-100.

4.2.2.4 – Preparo das amostras de plasma sanguíneo

As amostras de plasma sanguíneo foram fornecidas pelo Laboratório de Análises Clínicas Dr. Maricondi, em viais de plástico fechados com volumes de aproximadamente 2,0 mL.

4.2.3 – Procedimento Experimental

4.2.3.1 - Imobilização enzimática

As enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase foram imobilizadas em sílica de porosidade de 170 Å e 200-400 mesh CPG segundo protocolo estabelecido nos estudos apresentados no item 3.4.1 do capítulo 3.

Inicialmente, 0,2 g de CPG foi mantida em uma solução 4,5% v/v de ATPS, durante 40 min, agitando-se ocasionalmente. Na seqüência a solução foi retirada com o auxílio de uma seringa hipodérmica, adicionou-se 5,0 mL de uma solução de 2,5% v/v de glutaraldeído, a reação se processou durante 20 min, agitando-se ocasionalmente. Em seguida, o suporte contendo as enzimas imobilizadas foi lavados com uma solução de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0).

A quantidade de proteína imobilizada na CPG foi estimada pela diferença de proteína, determinada na solução de enzima, antes e após o procedimento de imobilização, empregando-se a metodologia de Hartree.⁷⁷

Após a imobilização, os suportes com as enzimas foram acondicionados em colunas de vidro (20 mm x 3 mm d.i.). Quando não estavam em uso, as colunas enzimáticas foram mantidas em solução de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0) sob refrigeração.

4.2.3.2 – Diagrama do módulo de análise em fluxo para a determinação quimiluminescente de colesterol em ovos

A Figura 4.2 apresenta o módulo de análise proposto para determinação de colesterol em ovos. Este módulo é constituído de 5 válvulas solenóides (V₁, V₂, V₃, V₄ e V₅) que controlam a inserção das soluções de reagentes e do transportador, uma alça de amostragem L₁ e um reator enzimático (2,0 cm x 3,0 mm), contendo a enzima colesterol oxidase imobilizada em sílica (CPG). O sistema de detecção quimiluminescente empregado foi aquele apresentado no item 2.3.2 do capítulo 2.

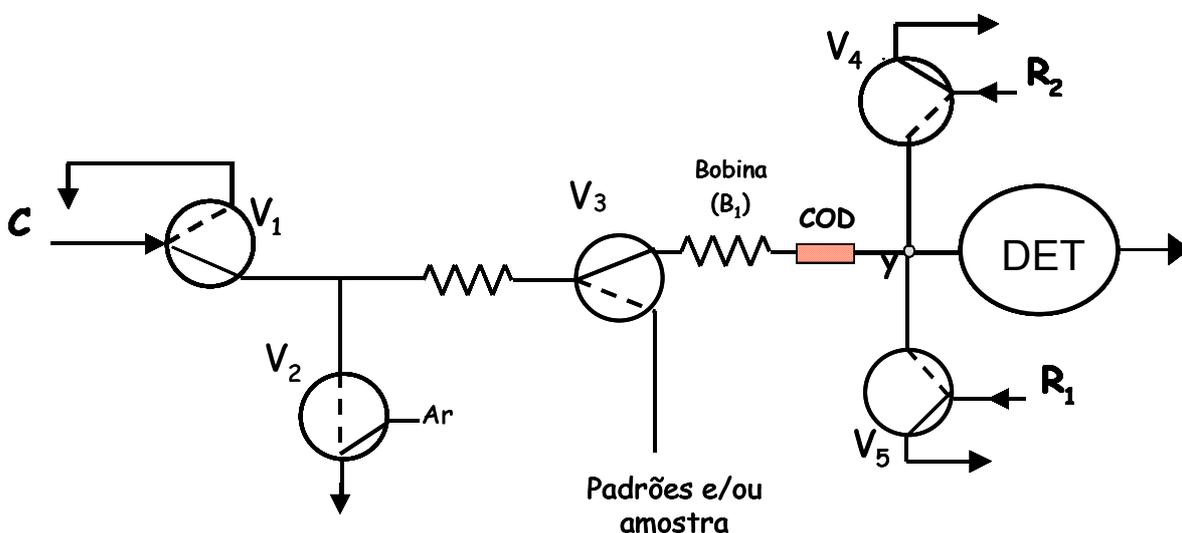


FIGURA 4.2 - Diagrama de fluxos do módulo de análise para a determinação de colesterol em ovos: válvulas solenóides de três vias: V₁ = controle da solução transportadora C (solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0); V₂ e V₃ = controle da solução de amostra e/ou padrões de colesterol; V₄ = controle da solução de luminol e V₅ = controle da solução de hexacianoferrato (III) de potássio. Y = Ponto

de confluência, L_1 = alça de amostragem, COD = coluna enzimática e sistema de detecção quimiluminescente DET.

O funcionamento do módulo de análise pode ser resumido em alguns passos. Inicialmente todas as válvulas estão desligadas e, como a válvula do transportador é ligada de forma invertida, apenas a solução transportadora flui pelo percurso analítico. Para a realização da introdução de uma alíquota de amostra ou padrão no sistema, as válvulas V_1 , V_2 e V_3 são acionadas durante um tempo pré-determinado, assim o fluxo da solução transportadora é interrompido (válvula V_1), a válvula V_2 quando acionada, funciona como um vácuo pela ação do sistema hidrodinâmico, permitindo assim que a solução de colesterol seja introduzida no percurso analítico pela válvula V_3 , até preencher a alça de amostragem L_1 . O volume de solução de colesterol inserido, depende do tamanho da alça de amostragem L_1 . Após o preenchimento da alça de amostragem, a solução de colesterol é transportada pelo carregador em direção à coluna no qual esta imobilizada a colesterol oxidase (COD). As válvulas V_4 e V_5 são acionadas e os reagentes luminol e hexacianoferrato (III) de potássio são introduzidos no sistema. Ocorre a mistura e reação destes reagentes com o peróxido de hidrogênio, produzindo a quimiluminescência que é então monitorada.

Estudos preliminares foram realizados a fim de se definir o tamanho da alça de amostragem L_1 . Posteriormente foram realizados estudos para a otimização do módulo como: vazão do carregador, concentração do luminol e ferricianeto, concentração hidrogeniônica, razão do volume dos reagentes quimiluminescentes e a determinação do colesterol em amostras de ovos.

4.2.3.3 – Diagrama do módulo de análise em fluxo para a determinação quimiluminescente de colesterol em plasma sanguíneo

Para a determinação de colesterol em plasma sanguíneo, no diagrama do módulo de análise apresentado na Figura 4.2 foram inseridos uma coluna enzimática, contendo a enzima colesterol esterase e uma bobina de dispersão B_1 de 25 cm. O módulo para a determinação de colesterol em plasma sanguíneo é apresentado na Figura 4.3.

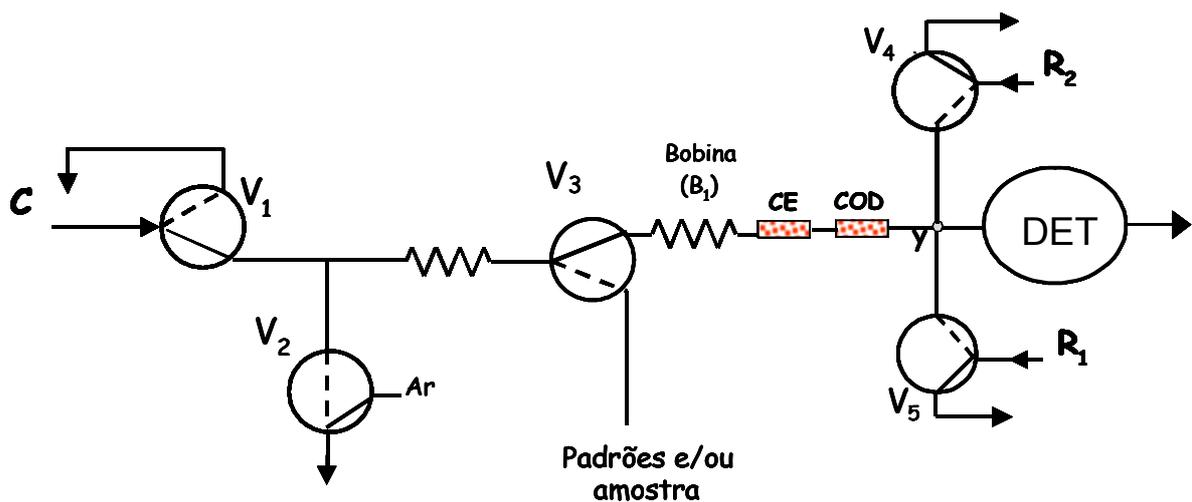


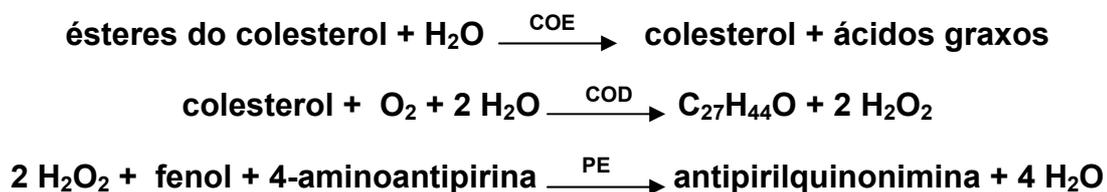
FIGURA 4.3 - Diagrama de fluxos do módulo de análise para a determinação de colesterol em plasma: válvulas solenóides de três vias: V₁ = controle da solução transportadora C (solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0); V₂ e V₃ = controle da solução de amostra e/ou padrões de colesterol; V₄ = controle da solução de luminol e V₅ = controle da solução de hexacianoferrato(III) de potássio. x e y = Pontos de confluência, L₁ = alça de amostragem, B₁ = bobina de mistura e diluição de 25 cm, CE = coluna enzimática (colesterol esterase), COD = coluna enzimática (colesterol oxidase) e sistema de detecção quimiluminescente DET.

Foram realizados vários experimentos com o módulo de análise descrito acima, a fim de se otimizar os parâmetros envolvidos no desenvolvimento das reações enzimáticas e quimiluminescente para a determinação de colesterol em amostras de plasma sanguíneo.

4.2.3.4 – Método comparativo

O método comparativo empregado para a análise de colesterol total foi o método enzimático com detecção espectrofotométrica realizado com um kit

comercial da empresa LABTEST DIAGNÓSTICA CAT nº 76⁸⁰. O princípio de determinação do colesterol total é apresentado nas equações abaixo.



Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase (COE) a colesterol livre e ácidos graxos. A enzima colesterol oxidase (COD), catalisa a oxidação do grupo 3 β -OH do colesterol livre, resultando como um dos produtos da reação o peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase (PE) e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina, que tem absorção máxima em torno de 530 nm. A intensidade da cor avermelhada formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

4.3 - Resultados e discussão

4.3.1 – Resultados obtidos na imobilização das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase.

Para avaliar a eficiência da imobilização das enzimas colesterol esterase e oxidase, monitorou-se a concentração de proteína na solução de enzimas, antes e após a imobilização no suporte (CPG). Por diferença, a concentração de colesterol oxidase e colesterol esterase imobilizadas foram de 1,21 mg de proteína/g de suporte (5,8 U) e de 7,1 mg de proteína/g de suporte (11,8 U), respectivamente.

4.3.2 – Resultados obtidos com o módulo de análise para a determinação de colesterol em ovos.

Inicialmente, no procedimento analítico proposto para a determinação de colesterol em amostras de ovos, avaliou-se o volume de amostra inserido no percurso analítico. Neste estudo, o tempo necessário para o preenchimento da maior alça de amostragem (150 μL) foi de 30 s. Portanto, nos estudos dos diferentes tamanhos de alça, o tempo de 30 s foi pré-estabelecido. Neste estudo, manteve-se um tempo de “delay” para o acionamento das válvulas V_4 e V_5 (luminol e hexacianoferrato (III)) de potássio de 8 s, após o preenchimento da alça de amostragem L_1 . A Figura 4.4 apresenta os resultados obtidos nestes estudos.

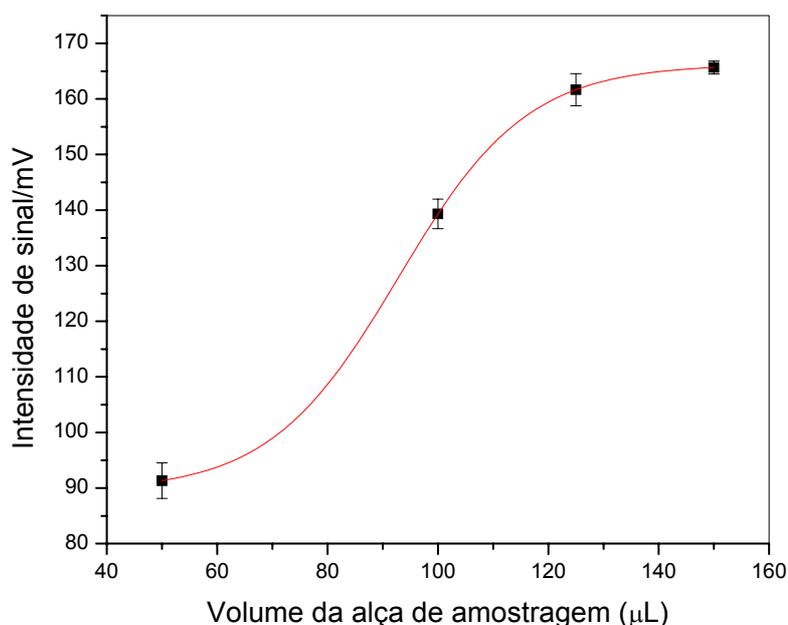


Figura 4.4. – Influência do volume da alça de amostragem sobre o sinal analítico, empregando o módulo de análise apresentado na Figura 4.2. (V_1) 0,1 mol L^{-1} de solução tampão fosfato pH 7,0 na vazão de 2,4 mL min^{-1} ; (V_2 e V_3) preenchimento da alça de amostragem L_1 (50 a 150 μL) com solução de colesterol 500 mg L^{-1} ($t_{\text{acionam.}}$ 30s); tempo de delay para acionamentos das válvulas V_3 e V_4 de 10s; (V_3 e V_4) 2,5 mmol L^{-1} de solução de luminol e 10,0 mmol L^{-1} da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min^{-1} ($t_{\text{acionam.}}$ 10 s).

Um aumento do sinal analítico, com o volume de amostra, é obtido até 125 μL , acima deste volume, o sinal analítico permaneceu praticamente constante, assim, nos estudos futuros fixou-se à alça de amostragem em 125 μL .

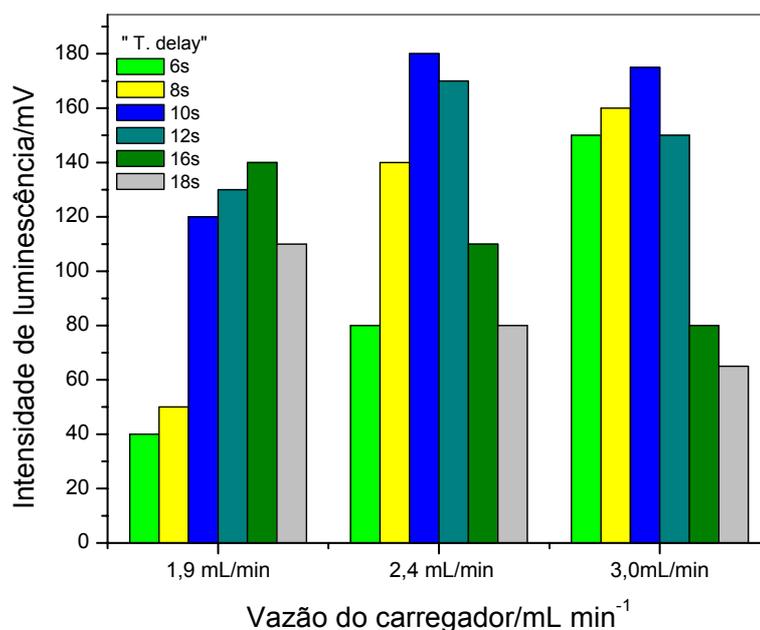


Figura 4.5. – Influência da vazão do carregador sobre o sinal analítico, empregando o módulo e análise da Figura 4.2. (V_1) 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato pH 7.0 em diferentes vazões 1,9 a 3,0 mL min⁻¹ (V_2 e V_3) preenchimento da alça de amostragem L_1 (125,0 μL) com solução de colesterol 500 mg L⁻¹ ($t_{\text{acionam.}}$ 30s); tempo de delay de (6 a 18 s); (V_3 e V_4) 2,5 mmol L⁻¹ de solução de luminol e 10,0 mmol L⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min⁻¹ ($t_{\text{acionam.}}$ 10 s).

Avaliou-se posteriormente o efeito da a vazão do carregador, sobre o sinal analítico conjuntamente com o tempo de espera “delay” para o acionamento das válvulas de luminol e hexacianoferrato (III) de potássio, após a inserção do plug de amostra no percurso analítico. A Figura 4.5 apresenta os resultados obtidos.

Com base no perfil dos resultados obtidos nestes estudos, fixou-se a vazão da solução transportadora em $2,4 \text{ mL min}^{-1}$. O tempo de delay, para o acionamento das válvulas de luminol e hexacianoferrato (III) de potássio, foi fixo em 10 s, após o preenchimento da alça de amostragem.

Definido o volume da alça de amostragem, a vazão do fluxo carregador e o tempo de delay para o acionamento das válvulas dos reagentes, estudou-se o efeito da concentração da solução de luminol no intervalo de 1,0 a $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ sobre o sinal analítico. A Figura 4.6 apresenta o gráfico dos resultados obtidos.

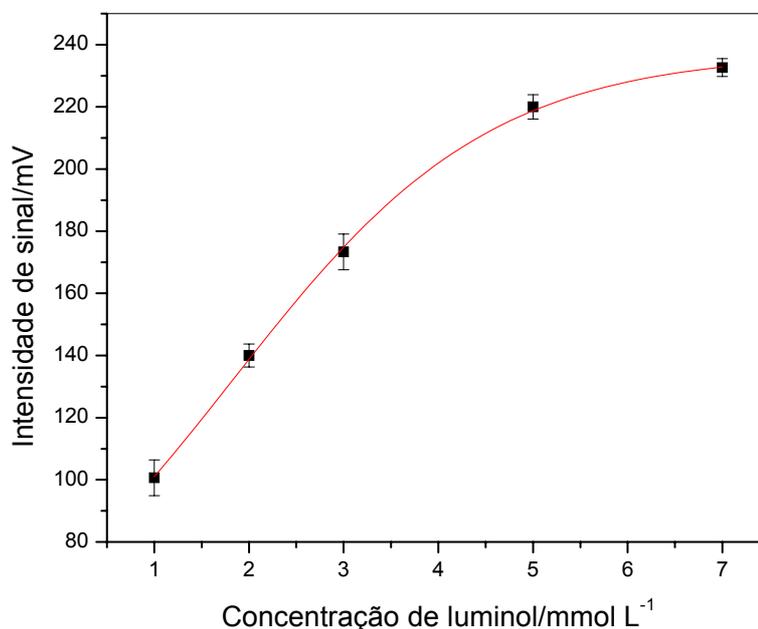


Figura 4.6 – Efeito da concentração de luminol sobre o sinal analítico, empregando o módulo e análise Figura 4.2. (V_1) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato pH 7.0 a $2,4 \text{ mL min}^{-1}$ (V_2 e V_3) preenchimento da alça de amostragem L_1 ($125,0 \mu\text{L}$) com solução de colesterol 500 mg L^{-1} ($t_{\text{acionam.}}$ 30s); tempo de delay de (10 s); (V_3 e V_4) $1,0$ a $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de solução de luminol e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{acionam.}}$ 10 s).

Um aumento do sinal analítico com a concentração da solução de luminol é observado até $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Concentrações superiores, $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$,

não representaram aumento significativo do sinal analítico. Portanto, para os trabalhos futuros, fixou-se a concentração da solução de luminol em 5,0 mmol L⁻¹.

Experimentos similares foram realizados para avaliar a influência do catalisador, hexacianoferrato(III) de potássio, sobre a magnitude do sinal analítico. Foram avaliadas concentrações deste reagente no intervalo de 5,0 a 50,0 mmol L⁻¹. Os resultados obtidos nestes estudos são mostrados na Figura 4.7.

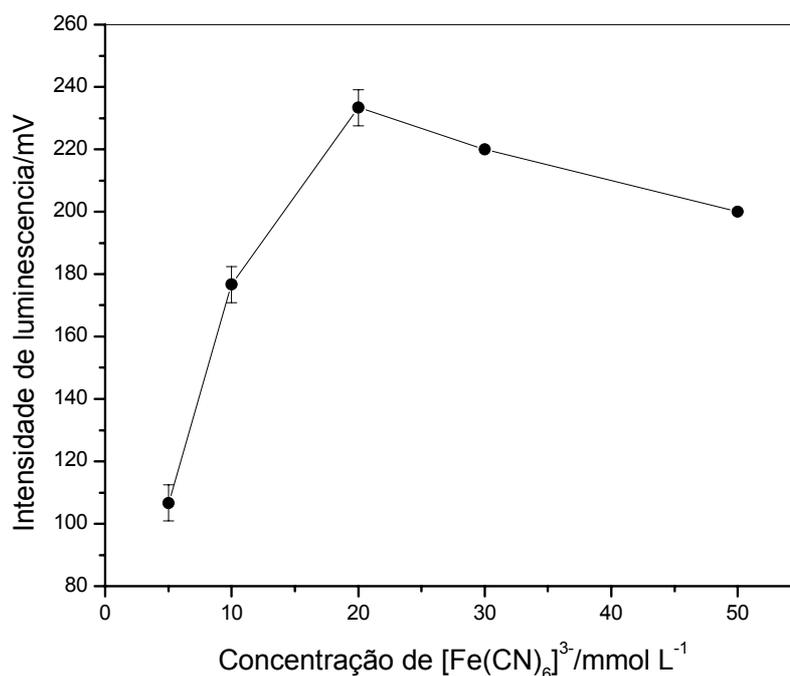


Figura 4.7 – Efeito da concentração de hexacianoferrato (III) de potássio sobre o sinal analítico empregando o módulo de análise apresentado na Figura 4.2. (V₁) 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato pH 7,0 a 2,4 mL min⁻¹; (V₂ e V₃) preenchimento da alça de amostragem L₁ (125,0 μL) com solução de colesterol 500 mg L⁻¹ (t_{acionam.} 30s); tempo de delay de (10 s); (V₃ e V₄) 5,0 mmol L⁻¹ de solução de luminol e 5,0 a 50,0 mmol L⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min⁻¹ (t_{acionam.} 10 s).

O perfil do sinal analítico obtido em função da variação da concentração de hexacianoferrato(III) de potássio, mostrou um aumento de sinal entre 5,0 a 20,0 mmol L⁻¹. Em concentrações superiores a 20,0 mmol L⁻¹, houve uma pequena diminuição do sinal analítico sendo provavelmente pela absorção

da luz gerada na quimiluminescência pela solução de ferricianeto. Sendo assim, a concentração de $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ deste reagente foi fixado para estudos futuros.

Avaliou-se a influência do pH da solução transportadora, sobre o sinal analítico. Assim, realizou-se um estudo variando-se o pH em 6,5; 7,0; 7,5; e 8,0. A Figura 4.8 apresenta os resultados obtidos neste estudo. Como pode ser observado nesta figura, a maior magnitude de sinal analítico foi obtida no intervalo de pH entre 7,0 e 7,5, sendo o pH fixado em 7,0 nos estudos futuros.

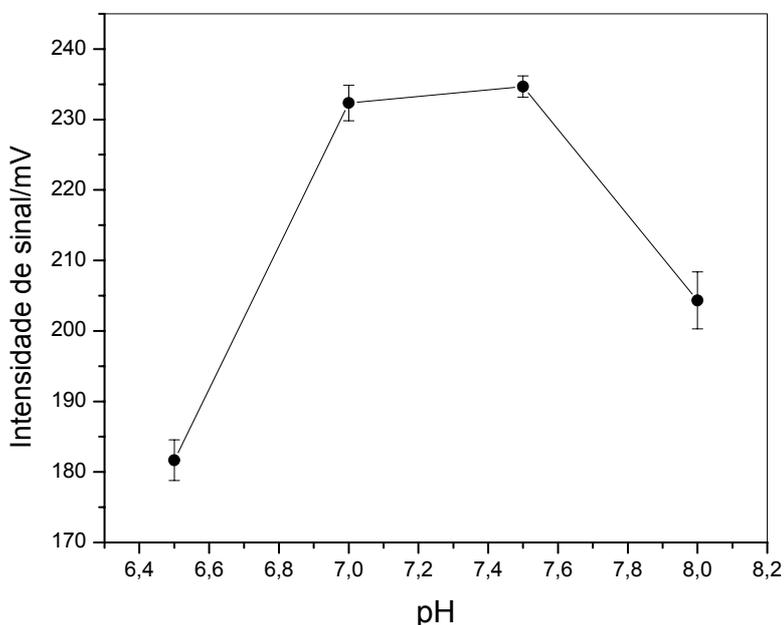


FIGURA 4.8 – Influência da concentração hidrogeniônica sobre o sinal analítico. (V_1) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato pH 6,5 a 8,0 a $2,4 \text{ mL min}^{-1}$; (V_2 e V_3) preenchimento da alça de amostragem L_1 ($125,0 \text{ } \mu\text{L}$) com solução de colesterol 500 mg L^{-1} ($t_{\text{acionam.}}$ 30s); tempo de delay de (10 s); (V_3 e V_4) $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de solução de luminol e $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{acionam.}}$ 10 s).

Posteriormente, avaliou-se a influência do volume dos reagentes luminol e hexacianoferrato (III) de potássio sobre a magnitude do sinal analítico. A concentração da solução de luminol (V_4) e da solução de hexacianoferrato (III) de

potássio (V_5) foi mantida em $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente. O efeito dos volumes destes reagentes foram avaliados, variando-se o tempo de acionamento das válvulas solenóides em 5, 7, 8 e 10 s. As vazões das soluções foram mantidas em $3,0 \text{ mL min}^{-1}$. Assim, os volumes das soluções de reagentes inseridos no percurso foram de aproximadamente 250, 350, 400 e 500 μL , respectivamente. A Figura 4.9 apresenta o perfil dos resultados obtidos sobre a magnitude do sinal analítico em função da variação do volume de luminol e hexacianoferrato(III) de potássio.

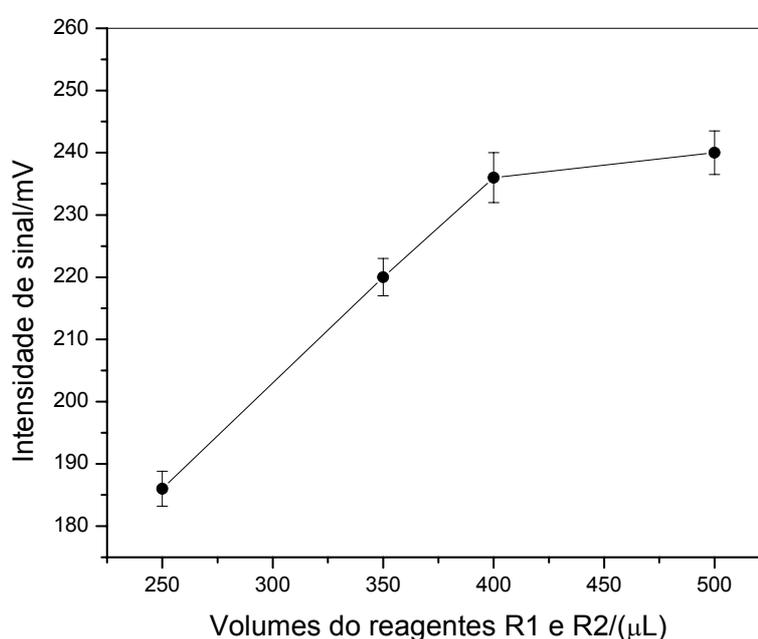


Figura 4.9 – Efeito do volume dos reagentes R_1 (luminol) e R_2 (hexacianoferrato(III) de potássio) inseridos no percurso analítico, sobre a magnitude do sinal. (V_1) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato pH 7,0 a $2,4 \text{ mL min}^{-1}$; (V_2 e V_3) preenchimento da alça de amostragem L_1 ($125,0 \mu\text{L}$) com solução de colesterol 500 mg L^{-1} ($t_{\text{acionam.}}$ 30s); tempo de delay de (10 s); (V_3 e V_4) $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de solução de luminol e $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{acionam.}}$ 5 a 10 s).

Nos estudos da variação dos volumes dos reagentes inseridos no percurso analítico, verificou-se um aumento significativo do sinal, no intervalo de

250 até 400 μL , (o mesmo perfil de resposta foi observado nos estudos para a glicose). Acima de 400 μL , não se evidencia aumento significativo da magnitude do sinal analítico. Portanto, o tempo de acionamento foi fixado em 8s, correspondendo a volumes dos reagentes de luminol e de hexacianoferrato(III) de potássio de ca. 400 μL . Considerando as concentrações destes reagentes, o consumo de luminol e hexacianoferrato(III) de potássio foi estimado em ca. 356,0 μg e 2,64 mg, respectivamente, por determinação.

A Tabela 4.1 apresenta os principais estudos realizados na otimização do sistema de análise em fluxo para a determinação de colesterol.

TABELA 4.1 – Parâmetros estudados na otimização do sistema em fluxo utilizado na determinação de colesterol em ovos

Parâmetro	Faixa estudada	Valor selecionado
Alça de amostragem (L_1)/ μL	50,0 a 150,0	125,0
Vazão do carregador/ mL min^{-1}	1,9 a 3,0	2,4
Tempo de “delay” /s	6 a 18	10
[luminol]/ mmol L^{-1}	1,0 a 7,0	5,0
[$\text{Fe}(\text{CN})_6$] $^{3-}$ / mmol L^{-1}	5,0 a 50	20
pH sol. transportadora	6,5 a 8,0	7,0
Volume dos reag. R_1 e R_2 μL (5 a 10s)	250 a 500	400 (8s)

A curva analítica obtida para as soluções de referência de colesterol é apresentada na Figura 4.10. As condições utilizadas para obtenção da curva analítica, são apresentadas na Tabela 4.1. A curva analítica obtida apresentou um comportamento linear no intervalo de concentração de 250,0 mg L^{-1} a 2500,0 mg L^{-1} , descrito pela equação: Intensidade (mV) = 43,0 + 0,325x[colesterol], R = 0,9997. Os sinais transientes obtidos para as concentrações crescentes de colesterol são apresentados na Figura 4.11.

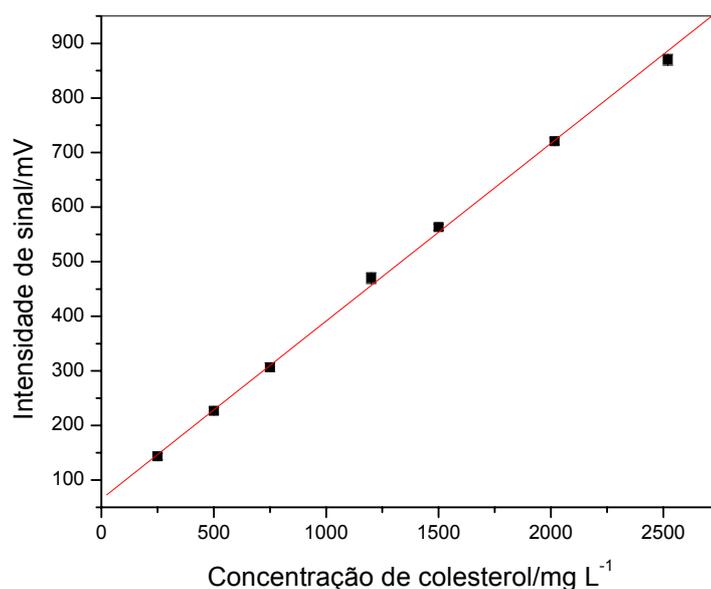


Figura 4.10 – Curva analítica obtida para as soluções de colesterol 250,0 a 2500 mg L⁻¹. (V₁) 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato pH 7,0 a 2,4 mL min⁻¹; (V₂ e V₃) preenchimento da alça de amostragem L₁ (125,0 μL) com soluções padrões e/ou amostras (t_{acionam.} 30s); tempo de delay de (10 s); (V₃ e V₄) 5,0 mmol L⁻¹ de solução de luminol e 20,0 mmol L⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min⁻¹ (t_{acionam.} 8 s).

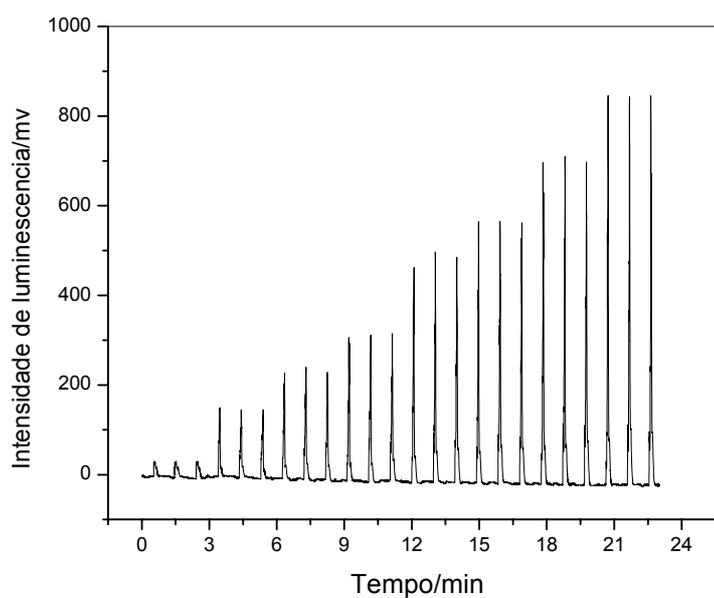


Figura 4.11 – Sinais transientes em triplicata obtidos para os padrões de colesterol de 250; 500; 750; 1200; 1500; 2016 e 2520 mg L⁻¹, empregando o módulo de análise nas condições otimizadas apresentadas da Tabela 4.1.

Estabelecidas as condições de operação do módulo de análise, o procedimento foi empregado na análise de colesterol em amostras de ovos. Os resultados obtidos bem como aqueles do procedimento comparativo, são apresentados na Tabela 4.2.

Duas metodologias de extração de colesterol em ovos foram empregadas, e devidamente descritas no item 4.2.2.3. Nas análises de colesterol no procedimento proposto, apenas as amostras de colesterol que foram extraídas empregando-se a segunda metodologia (procedimento empregando a saponificação) apresentaram respostas no sistema analítico.

TABELA 4.2- Determinação do teor de colesterol em amostras de ovos pelo método proposto e pelo método comparativo (Kit enzimático)

Amostras	Comparativo	Proposto	Er (%)
	mg de colesterol/ (15g) gema de ovo		
Ovos brancos	220 ± 3	223 ± 7	1,3
Ovos brancos	240 ± 5	236 ± 4	-1,7
Ovos vermelhos	219 ± 4	214 ± 7	-2,3
Ovos vermelhos	213 ± 5	219 ± 8	2,8

n = 3

4.3.3- Resultados obtidos com o módulo de análise para a determinação de colesterol em plasma sanguíneo.

Também foi realizada a determinação de colesterol em plasma sanguíneo, empregando o procedimento em fluxo com detecção por quimiluminescência. O grande dilema de arterosclerose é que ela é um processo silente. Está ativa em todos os indivíduos e permanece sem qualquer manifestação por décadas e, subitamente se manifesta através da dor torácica, infarto agudo do miocárdio ou morte súbita. Estudos realizados nos Estados Unidos demonstraram uma correlação positiva entre os níveis de colesterol, mais especificamente do colesterol LDL e o risco de doença arterial coronariana (DAC). Ao mesmo tempo, ficou evidenciado que os níveis de colesterol HDL são

inversamente proporcionais ao risco de DAC. Valores significativos de colesterol são encontrados na nefrose, hipotireoidismo, doença colestáticas do fígado e nas hiperlipoproteïnemias dos tipos IIa, IIb e III. Baixos níveis de colesterol também são correlacionados a doenças consuptivas e desnutrição crônica. Além do colesterol sérico, a hipertensão e o fumo constituem fatores de risco de aterosclerose e DAC⁶⁴. Os valores de referência da concentração de colesterol em plasma são: desejável < 200 mg/dL, considerado como risco moderado 200 a 239 mg/ dL e considerado de alto risco concentrações superiores a 240 mg/dL. Com base nestes dados, foram realizadas algumas alterações na configuração do módulo de análise, empregado anteriormente para a determinação de colesterol em ovos. A reconfiguração do módulo de análise foi realizada a fim de se minimizar o máximo possível à manipulação da amostra, bem como as diluições necessárias, o emprego de um menor volume de amostra possível, uma vez que em geral são disponibilizados 2,0 mL de plasma para a análise e, que a linearidade de resposta ficasse o mais próximo possível, com os resultados normalmente obtidos na quantificação de colesterol a níveis considerados como sadios para pessoas. Neste procedimento, além do reator enzimático da enzima colesterol oxidase, foi utilizado um reator enzimático contendo a enzima colesterol estearase, imobilizada em sílica de porosidade controla (4.2.3.1). O descarte das soluções, bem como a solução do sistema de injeção hidrodinâmica, foram realizados em um frasco contendo solução de hipoclorito de sódio 5% v/v. O módulo de análise proposto é apresentado na Figura 4.3.

Inicialmente foi avaliado o tamanho da alça de amostragem de 5,0 a 20,0 cm (25 a 100 μ L), sobre o sinal analítico. Neste estudo, uma bobina de 25 cm (B1), foi colocada antes dos reatores enzimáticos. Com base nos resultados obtidos, foi fixado uma alça de amostragem de 10 cm (50 μ L) e uma bobina (B1) de 25 cm.

A mudança do percurso analítico, alça de amostragem, bobina de mistura, e reator com a enzima colesterol esterase, foi avaliado para se determinar o tempo ideal para o acionamento das válvulas V₄ e V₅ (solução de luminol e hexacianoferrato (III) de potássio), após a inserção do “plug” das soluções padrões e/ou amostra no percurso analítico. Ademais, o efeito da vazão

da solução carregadora sobre o sinal analítico também foi investigado. A Figura 4.12 apresenta os resultados obtidos nestes estudos.

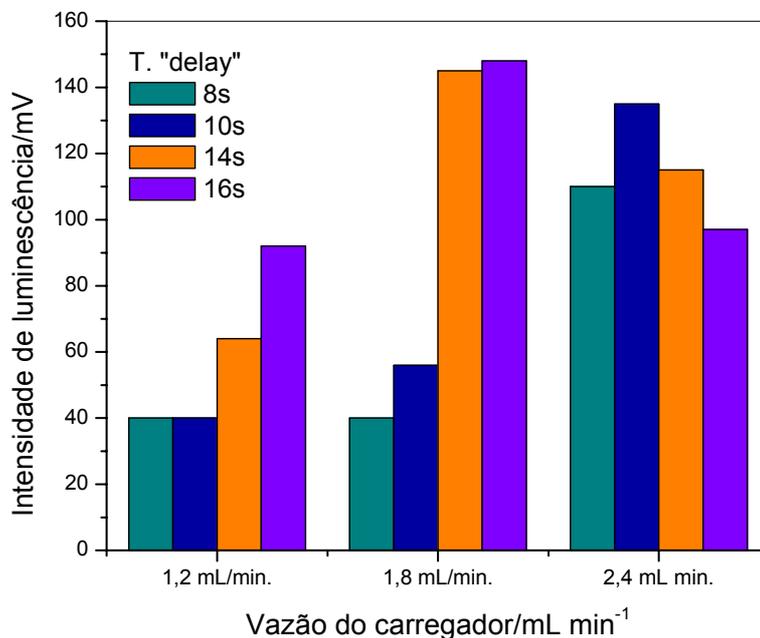


Figura 4.12 - Efeito da vazão da solução carregadora e do tempo de “delay” para o acionamento das válvulas (V_4 e V_5) após a introdução dos padrões e/ou amostra no percurso analítico. Alça de amostragem L_1 de $50,0 \mu\text{L}$; Bobina de dispersão B_1 de 25 cm ; V_1 = solução tampão fosfato pH 7,0 (carregador) nas vazões de 1,2 a $2,4 \text{ mL min}^{-1}$; (V_2 e V_3) solução de colesterol $1250,0 \text{ mg L}^{-1}$; tempo de delay de 8 a 16 s; (V_4 e V_5) $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de solução de luminol e $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ (t acionam. 8 s).

Observa-se no gráfico da Figura 4.12, que as melhores condições estabelecidas entre as reações enzimáticas (colesterol estearase e oxidase), e a reação, do peróxido de hidrogênio gerado e os reagentes luminol e hexacianoferrato(III) de potássio foi obtida, quando a vazão do carregador ($25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato pH 7,0) foi de $1,8 \text{ mL min}^{-1}$ associado a um tempo de “delay”, para o acionamento das válvulas V_4 e V_5 , entre 14 a 16s. Portanto, nos estudos posteriores, a vazão da solução transportadora foi fixada em $1,8 \text{ mL min}^{-1}$, conjuntamente com o tempo de delay de 14s.

Avaliou-se também o tempo de acionamento das válvulas V_4 e V_5 que correspondem a diferentes volumes de reagentes (100 a $400 \mu\text{L}$), luminol e

hexacianoferrato (III) de potássio no percurso analítico. Neste estudo, diferentes concentrações de colesterol foram avaliadas. A Figura 4.13, apresenta os resultados obtidos, variando-se o tempo de acionamento das válvulas V_4 e V_5 respectivamente.

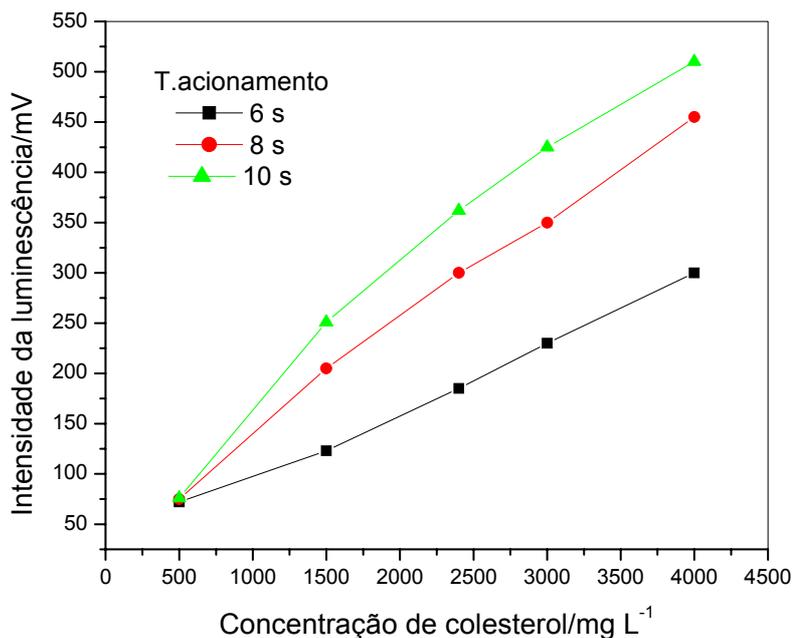


Figura 4.13 – Magnitude do sinal analítico em função do tempo de acionamento das válvulas V_4 (luminol) e V_5 (hexacianoferrato(III)) para diferentes concentrações de colesterol, empregando o módulo de análise nas seguintes condições. Alça de amostragem L_1 de 50,0 μL ; Bobina de dispersão B_1 de 25 cm; V_1 = solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 (carregador) na vazão de 1,8 mL min^{-1} ; (V_2 e V_3) solução de colesterol 500 mg L^{-1} a 4000 mg L^{-1} ; tempo de delay de 14 s; (V_4 e V_5) 5,0 mmol L^{-1} de solução de luminol e 20,0 mmol L^{-1} da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min^{-1} (t acionam. 6 a 10 s).

Analisando-se as curvas analíticas obtidas, verifica-se um aumento da sensibilidade em função do aumento tempo de acionamento das válvulas e/ou do aumento do volume dos reagentes (luminol e hexacianoferrato(III)) de

potássio). Entretanto, entre os tempos de 8 a 10 s (que correspondem a 400 e 500 μL), não se observa um aumento significativo da sensibilidade. Assim, em função da economia destes reagentes e faixa linear de resposta obtida, o tempo de acionamento das válvulas V_4 e V_5 foram fixados em 8s, que corresponde a aproximadamente 400 μL , de luminol e hexacianoferrato(III) de potássio inserido no percurso analítico.

Avaliou-se também a interferência de possíveis íons e compostos orgânicos que poderiam estar presentes nas amostras de plasma sanguíneo. Portanto, soluções de diferentes concentrações de: glicose, uréia, ácido úrico, ácido ascórbico, e os íons: Cu^{2+} , Zn^{2+} , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} e Fe^{2+} , foram adicionadas a solução de colesterol de 2000,0 mg L^{-1} , sendo os resultados obtidos apresentados na Tabela 4.3.

Os resultados obtidos neste estudo, mostraram que os agentes redutores, ácido úrico e ascórbico, nas concentrações estudadas, proporcionam recuperações abaixo de 90%. A presença dos íons Cu^{2+} e Zn^{2+} , nas concentrações estudadas, proporcionaram um aumento do sinal em 9% e 17,4%, respectivamente. As outras espécies químicas praticamente não influenciaram de forma significativa o sinal analítico, quando comparado com o valor de referência.

Entretanto, na determinação de colesterol em amostras de plasma sanguíneo, não foram observadas diferenças significativas, quando comparado com o método comparativo (Kit enzimático)⁸

TABELA 4.3 – Efeito de algumas espécies químicas na determinação do colesterol total em plasma sanguíneo

Valor de referência	Concentração (mg L ⁻¹)	Sinal (mV)	Recuperação(%)
Colesterol	2000	253 ± 3	100
Espécie adicionada			
glicose	1000	252 ± 3	99,6
uréia	200	253 ± 2	100
Ac. úrico	100	226 ± 3	89,3
Ac. ascórbico	0,10	223 ± 3	88,1
Cu ²⁺	0,01	276 ± 3	109
Zn ²⁺	0,01	297 ± 3	117
K ⁺	100	253 ± 4	100
Na ⁺	1000	254 ± 2	100
Ca ²⁺	90	245 ± 3	96,8
Fe ²⁺	0,005	246 ± 4	97,2
n=3			

A curva analítica obtida para as soluções de referência de colesterol é apresentada na Figura 4.14. A curva analítica apresentou um comportamento linear no intervalo de concentração de 500,0 a 4000,0 mg L⁻¹, descrito pela equação: Intensidade (mV) = 40,0 + 0,105x[colesterol], R = 0,998. Os sinais transientes obtidos para as concentrações crescentes de colesterol, são apresentados na Figura 4.15.

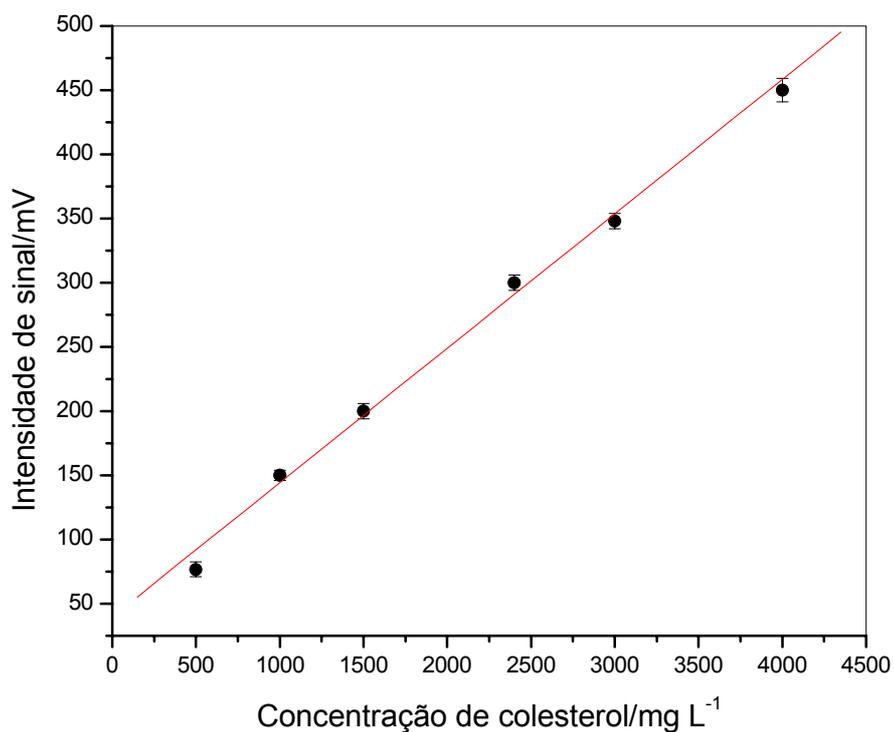


Figura 4.14 - Curva analítica obtida para as soluções de colesterol 500,0 a 4000 mg L⁻¹, empregando o módulo de análise da Figura 4.3 nas seguintes condições: Alça de amostragem L₁ de 50,0 μL; Bobina de dispersão B₁ de 25 cm; V₁ = solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 (carregador) na vazão de 1,8 mL min⁻¹; (V₂ e V₃) solução de colesterol 500 mg L⁻¹ a 4000 mg L⁻¹; tempo de delay de 14 s; (V₄ e V₅) 5,0 mmol L⁻¹ de solução de luminol e 20,0 mmol L⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio, respectivamente, nas vazões de 3,0 mL min⁻¹ (t_{acionam.} 8 s).

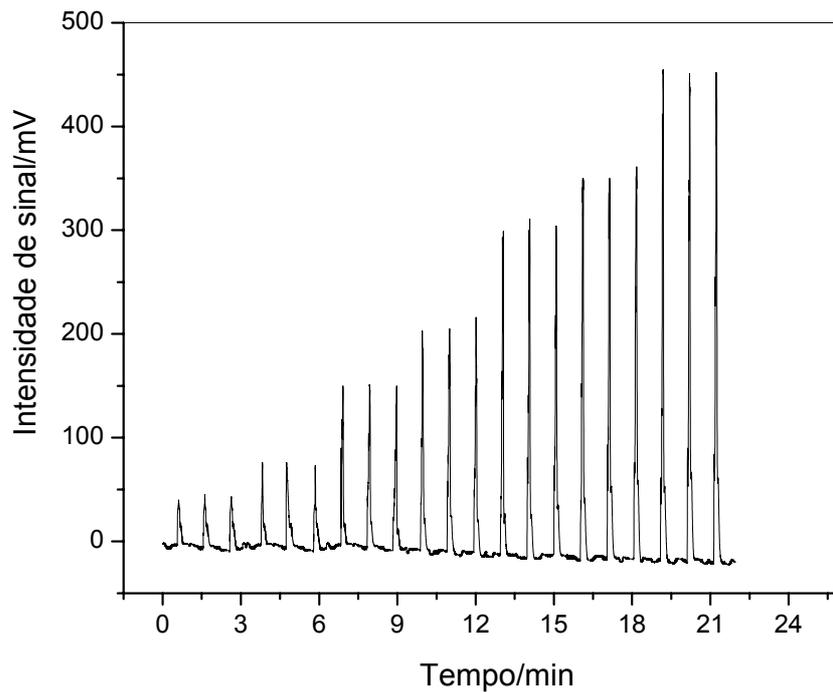


FIGURA 4.15 - Registro dos sinais transientes referentes à determinação de colesterol com soluções de referência entre 500 e 4000 mg L⁻¹ de colesterol empregando o módulo de análise nas condições descritas na Figura 4.14.

Outras características analíticas foram obtidas, tais como frequência de amostragem de 55 determinações por hora, limite de detecção ($3\sigma_{bc0}/\text{inclinação da curva}$) de 60,9 mg L⁻¹ e, desvio padrão relativo de 2,9% estimados através de 10 replicatas. O consumo de reagentes foi estimado em 356,0 μg de luminol e 2,64 mg de hexacianoferrato (III) por determinação de colesterol.

Na Tabela 4.4 são apresentadas algumas figuras de mérito dos procedimentos e/ou métodos empregados para a determinação de colesterol em plasma sanguíneo, bem como as do procedimento proposto.

TABELA 4.4 – Procedimentos analíticos em fluxo empregados para a determinação de colesterol em amostras clínicas

Método/detecção	Linearidade (mg L ⁻¹)	R.S.D (%)	Freqüência Analítica (h ⁻¹)	Ref.
Biossensor/Quimiluminescente	0,005 a 0,100	2	12	65
Amperométrico	30 a 3000	1,5	40	66
Espectrofotométrico (FIA)	42 a 3325	2,5	45	69
Potenciométrico	19 a 1160	3,0	30	72
Espectrofotométrico (SFA)	500 a 4000	3,0	42	74
Quimiluminescente	25 a 125	2,3	40	75
Proposto	500 a 4000	3,0	55	

Apesar do procedimento quimiluminescente proposto não apresentar uma sensibilidade superior ou maior freqüência analítica, quando comparados com alguns procedimentos apresentados na Tabela 4.4, destaca-se a simplicidade do sistema de detecção, bem como seu baixo custo. Além disso, cabe ressaltar que a otimização do procedimento, objetivou a análise da amostra de plasma sanguíneo diretamente, ou seja, as amostras de plasma eram inseridas diretamente no fluxo carregador, sem a necessidade de diluições e/ou pré-tratamento da amostra.

TABELA 4.5 - Resultados obtidos na determinação de colesterol total em amostras de plasma sanguíneo empregando o sistema proposto e o método comparativo⁸⁰

Amostra	Comparativo <i>Kit-enzimático</i> (mg L ⁻¹)	Sistema proposto (mg L ⁻¹)	E(%)
S1	819 ± 5	803 ± 6	- 2
S2	1316 ± 9	1293 ± 9	- 1,8
S4	2637 ± 13	2614 ± 19	- 0,9
S3	815 ± 4	795 ± 5	- 2,5

n=3

Avaliando o conjunto de resultados estatisticamente (aplicação do teste *t* pareado), não foi observada diferença significativa entre os mesmos a um nível de confiança de 95%, estando os erros relativos em um intervalo aceitável.

Após a comparação dos métodos, avaliou-se a estabilidade do sistema durante 6 horas de trabalho. Neste estudo, a cada meia hora eram realizadas medidas em triplicata de uma solução de referência de colesterol 2500 mg L⁻¹. Observou-se que o sistema apresentou boa estabilidade, apresentando um desvio padrão de 5,6% entre as medidas ao longo deste período.

4.4 - Conclusões

O procedimento analítico em fluxo com detecção quimiluminescente proposto para a determinação de colesterol total em ovos, é preciso e exato sendo necessário no entanto uma etapa prévia de manipulação (morosa) da extração de colesterol da amostra. Os resultados obtidos neste procedimento foram concordantes com o método comparativo (kit-enzimático). Com o emprego das válvulas solenóides para o gerenciamento dos reagentes no percurso analítico, verificou-se um baixo consumo de luminol e hexacianoferrato(III) 356 µg e 2,64 mg, respectivamente. O procedimento analítico proposto para a análise de colesterol em plasma sanguíneo apresentou-se adequado e preciso, sendo possível a quantificação de colesterol nas amostras sem a necessidade de diluições e/ou prévio tratamento da amostra.

CAPÍTULO 5.

Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras

O monitoramento da radiação quimiluminescente empregando-se o fotodiodo de silício bem como a cela de fluxo de polietileno mostraram-se adequados para a implementação de procedimentos analíticos em fluxo, tendo como principais qualidades o baixo custo de implantação e a facilidade operacional.

A implementação do conceito de multicomutação nos procedimentos analíticos em fluxo para a determinação de peróxido de hidrogênio, glicose e colesterol, em diferentes matrizes, se destaca pela versatilidade (alteração do módulo de análise em função das características das amostras) e reduzido consumo de reagentes em relação aos procedimentos clássicos de análises em fluxo, além da facilidade operacional.

Empregando-se as enzimas (glicose oxidase, colesterol esterase e colesterol oxidase) nos procedimentos analíticos em fluxo, obteve-se a seletividade necessária para a determinação de glicose e colesterol em amostras alimentícias e bioquímicas. Ademais, verificou-se a potencialidade do emprego de enzimas imobilizadas em procedimentos analíticos em fluxo, como a possibilidade da reutilização do material biológico.

Uma importante tendência observada em Química Analítica consiste no desenvolvimento de “métodos limpos”, no qual se estabelecem certas prioridades que consistem no emprego de reagentes de baixa toxicidade, na redução da geração de resíduos contendo reagentes tóxicos e no tratamento destes resíduos previamente ao descarte. De um modo geral, os procedimentos analíticos em fluxo propostos contemplaram as duas primeiras metas, pelo emprego de reagentes imobilizados (catalisadores enzimáticos) e pela redução do consumo de reagentes pela adição intermitente nos sistemas de análise em fluxo (multicomutação).

Em continuidade aos trabalhos propostos, sugere-se a determinação seqüencial de glicose e colesterol nas amostras de plasma sanguíneo, bem como outros metabólitos importantes, como ácido úrico, creatinina, etc. empregando o conceito de multicomutação com detecção por quimiluminescência. O estudo com

outros sistemas quimiluminescentes (peróxi-oxalato, pirogalol, etc) também poderá ser realizado, bem como a utilização de compostos que intensifiquem a luminescência como alguns surfactantes, a fim de se obter procedimentos analíticos com maiores sensibilidades. Procedimentos analíticos em fluxo empregando eletroquimilumiscência é uma tendência de pesquisa, pelas condições disponíveis no laboratório do Prof. Fatibello.

CAPÍTULO 6.

Referências Bibliográficas

1. DODEIGNE, C; THUNUS, L.; LEJEUNE, R. "Chemiluminescence as a diagnostic tool. A review". *Talanta*, **51**: 415,1999.
2. MOTTOLA H. A. *Chemical Analysis- Kinetics Aspects of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1988 p. 438.
3. ALBRECHT, H. O. "Chemiluminescence of aminophthalic hydrazide". *Z. Physik Chem.*, **135**: 321, 1928.
4. JIMENEZ, A. M.; NAVAS, M. J.; GALAN, G. "Chemiluminescence Methods in Agrochemical analysis." *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **27**: 291, 1997.
5. CALATAYUD, M., J.; ORTIZ, L.S. *Cienc. Pharma* **4**:190, 1994.
6. ROBARDS, K.; WORSFOLD, P. J. "Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence". *Anal. Chim. Acta*, **266**: 147, 1992.
7. GUNDERMAN, K. D.; MCCAPRA, F. *Chemiluminescence in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, 1987.
8. MER`WNYI, G.; LIND, J.; ERIKSEN, T.E. "Oxidation potential of luminol – Is the autoxidation of singlet organic-molecules an outer-sphere electron transfer". *J. Phys. Chem.* **94**: 748, 1990.
9. ALBERTIN, R.; ARRIBAS, M., A., G.; BASTOS, E. L.; ROPKES, S.; SAKAI, P. N.; SANCHES, A. M. M.; STEVANI, C. V.; UMEZU, I. S.; YU, J. ; BAADER, W. J. "Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para a sala de aula". *Quim Nova.* **21(6)**:772, 1998.
10. FERREIRA, E. C. Aplicações Analíticas do Estudo da Reação Quimiluminescente de Luminol, Campinas, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, 2001, Dissertação de mestrado, 169p.
11. LEHNINGER, A. L. *Princípios da Bioquímica*. 2a ed. São Paulo, Savier, 1995. 839p.
- 12 SAID, S.; PIETRO, R., C. L. R. Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico, Livraria e Editora Eventos, Rio de Janeiro, 2002. 121p.
13. FATIBELLO-FILHO, O. & CAPELATO, M. D. "Biossensores". *Quim. Nova*, **15**: 28, 1992.

- 14- BULLOCK C. *Immobilized Enzyme Science Progress*, v.78 n.2, 1995, 134p.
15. GUILBAULT, G. G.;SULEIMAN, A. A.; FATIBELLO-FILHO, O & NABI RAHNI, M. A. "Immobilized Bioelectrochemical Sensors" IN: *Bioinstrumentation and Biosensor*, WISE, D. L. (Ed). New York, Marcel Dekker, 1991, p.659.
16. LAM, S.; MALIKIN, G. *Analytical Applications of Immobilized Enzyme Reactors*, Blackie Academic & Professional, 1994. 276p.
17. RUZICKA, J. & HANSEN, E. H. "Flow injection analysis. Part 1. A new concept of fast continuous flow analysis". *Anal. Chim. Acta*, 78: 145, 1975.
18. KRONKA, E. A. M.; REIS, B. F.; VIEIRA, J. A; BLANCO, T. & GERVASIO, A. P.G. "Multicomutação e amostragem binária em análise química em fluxo. Determinação espectrofotométrica de ortofosfato em águas naturais". *Quim. Nova*, **20**(4): 372, 1997.
19. KINGSTON, H. M. & KINGSTON, M. L. "Nomenclature in laboratory robotics and automation". *J. Autom. Chem.*, 16: 43, 1994.
20. PASQUINI, C. & OLIVEIRA, W. A. "Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium (VI), ammonia, and phosphorus". *Anal. Chem.*, **57**: 2575, 1985.
21. RUZICKA, J. & MARSHALL, G. D. "Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays". *Anal. Chim. Acta*, **237**: 329, 1990.
22. REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; ZAGATTO, E. A G.; LIMA, J. L. F. C. & LAPA, R. A. "Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plants digests". *Anal. Chim. Acta*, **293**:129, 1994.
23. ROCHA, F. R. P. "Determinações seqüenciais em sistemas de injeção em fluxo empregando multicomutação e multidetecção", São Carlos, Universidade Federal de São Carlos-UFSCar, 2000, Tese de doutorado 177p.
24. MARTELLI, P. B.; REIS, B. F.; KRONKA, E. A. M.; BERGAMIN FILHO, H.; KORN, M.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C. & ARAUJO, A. N. "Multicommutation in flow analysis. Part 2. Binary sampling for spectrophotometric determination of nickel, iron and chromium in acid solution of steel alloys". *Anal. Chim. Acta*, 308: 397, 1995.
25. ICARDO, M.C.; MATEO, J.V.G.; CALATALAYUD, J.M. "Multicommutation as a powerful new analytical tool". *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **21**(5): 366-378, 2002.

26. ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A.; SANTOS, J. L. M. "Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends". *Anal. Chim. Acta*, **468**: 119, 2002.
27. MESTRE, Y. F.; ZAMORA, L. L.; CALATALYUD, J. M. "Flow-chemiluminescence: a growing modality of pharmaceutical analysis". *Luminescence*, **16**:213, 2001.
28. FLETCHER, P.; ANDREW, K. N.; CALOKERINOS, A. C.; FORBES, S.; WORSFOLD, P. J. "Analytical applications of flow injection with chemiluminescence detection- a review". *Luminescence*, **16**:1, 2001.
29. TURNER, G. K. *Measurement of light from chemical and biochemical reactions*. IN: *Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications*. Vol. I, CRC Press, 1985. p. 43-78.
30. FERREIRA, E. C.; ROSSI, A. V. "A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicação da reação do luminol em métodos cinéticos de análise" *Quim. Nova*, **25**:1003, 2002.
31. ROSE, A. L.; WAITE, T. D. "Chemiluminescence of luminol in the presence of iron(II) and oxygen: oxidation mechanism and implications for its analytical use". *Anal. Chem.*, **73**(24): 5909, 2001.
32. KOENER, C.; NIEMAN T.A. "Chemiluminescence flow injection analysis determination of sucrose using enzymatic conversion and a microporous membrane flow cell" *Anal. Chem.*, **58**:116, 1986.
33. CAIBIN, X.D.; WHTNEY, K.; PALMER, D.A.; WESOLOWSKI, D.J. "Study of enhancement effects in the chemiluminescence method for Cr(III) in the ng L⁻¹ range". *Anal. Chim. Acta*, **415**(1-2): 209, 2000.
34. LAN, Z. H.; MOTTOLA, H. A. "Carbon dioxide-enhanced luminol chemiluminescence in the absence of added oxidant". *Analyst*, **121**(2):211, 1996.
35. XIAO, C.; PALMER, D. A.; WESOLOWSKI, D. J.; LOVITZ, S. B.; KING, D. W.; "Carbon dioxide effects on luminol and 1,10-phenanthroline chemiluminescence". *Anal. Chem.*, **74**(9): 2210, 2000.
36. STIEG, S.; NIEMAN T.A. "Experimental and theoretical considerations of flow cell design in analytical chemiluminescence". *Anal. Chemistry*, **50**(3):401, 1978.
37. HAYASHI, K.; SASAKI, S.; IKEBUKURO, K.; KARUBE, I. "Highly sensitive chemiluminescence flow injection analysis system using microbial peroxidase and photodiode detector". *Anal. Chim. Acta*, **329**: 127, 1996.
38. KIBA, N.; TACHIBANA, M.; TANI, K.; MIWA, T. "Chemiluminometric branched chain amino acids determination with immobilized enzymes by flow-injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, **375**:65, 1998.

39. BORGES, E. P.; FERNANDES, E. N.; ROCHA, F. R. P.; REIS B. F. "Desenvolvimento de um dispositivo de baixo custo para medidas por quimiluminescência". *Quim Nova*, **25**(6): 1191, 2002.
40. KIBA, N.; TACHIBANA, M.; TANI, K.; MIWA, T. "Chemiluminometric determination of uric acid plasma by closed-loop FIA with a coimmobilized enzyme flow cell." *Anal. Sci.*, **16**: 1203, 2000.
41. KIBA, N.; ITO, S.; TACHIBANA, M.; TANI, K.; KOIZUMI, H. "Flow-through chemiluminescence sensor using immobilized oxidases for the selective determination of L-glutamate in a flow injection system". *Anal. Sci.*, **17**: 929, 2001.
42. KIBA, N.; INOUE Y.; TACHIBANA, M.; TANI, K.; KOIZUMI, H. "Simultaneous determination of D-glucose and 3-hydroxybutyrate by chemiluminescence detection with immobilized enzymes in a flow injection system". *Anal. Sci.*, **19**: 1203, 2003.
43. GARCIA-CAMPANA, A. M.; BAEYEM, W. R. G. "Principles and recent analytical applications of chemiluminescence" *Analisis*, **28**(8): 686, 2001.
44. LEITE, O. D. FATIBELLO-FILHO, O.; ROCHA, F. R. P. "Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência". *Quim Nova*, **27**(2): 337, 2004.
45. MARTELLI, P. B.; REIS, B. F.; ARAÚJO, A. B. CONCEIÇÃO, C; MONTENEGRO, B. S. M.; "A flow system with a conventional spectrophotometer for the chemiluminescent determination of lactic acid in yoghurt". *Talanta*, **54**(5): 879, 2001.
46. PIRES, C. K. "Desenvolvimento de procedimentos automáticos para a determinação de 3-hidroxibutirato, glicose e colesterol em soro de sangue animal empregando multicomutação em fluxo". São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2003, tese de doutorado, 147p.
47. DIAZ, A. N.; SANCHEZ, F. G.; GARCIA, J. A. G. " Hydrogen peroxid assay by using enhanced chemiluminescence of the luminol-H₂O₂-horseradich peroxidase system: comparative studies" *Anal. Chim. Acta*, **327**: 161, 1996.
48. PALILIS, L. P.; CALOKERINOS, A. C. " Analytical applications of chemiluminogenic reactions". *Anal Chim. Acta*: **413**: 175, 2000.
49. ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, " Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit". *Analyst*, **112**(2) 199, 1987.
50. ROCHA, F. R. P.; RÓDENAS-TORRALBA, E.; REIS, B. F.; MORALES-RÚBIO, A.; de la GUARDIA, M.; "A portable and low cost equipment for flow injection chemiluminescence measurements." *Talanta*, **67** 673, 2005.

51. NIEMAN, T. A.; CATHY, A.; KOERNER, S. "Flow-Injection determination of sugars with immobilized enzyme reactors and chemiluminescence detection" . *Anal. Chim. Acta*, 205: 195, 1988.
52. GORTON, L. & OGREN, L.; "Flow injection analysis for glucose and urea with enzyme reactors and on-line dialysis". *Anal. Chim. Acta*, **130**: 45, 1981.
53. HUANG, Y. L.; LI, S. Y.; DREMEL, B. A. A.; BILITEWSKI, U.; SCHMID; R. D. "Online determination of glucose concentration throughout animal-cell cultures based on chemiluminescent detection of hydrogen-peroxide coupled with flow-injection analysis". *J. Biotechnol.*, **18**:161, 1991.
54. YAO, T.; SATOMUIRA, M; NAKAHARA, T.; "Amperometric flow-injection determination of glucose, urate and cholesterol in blood serum by using some immobilized enzyme reactors and a poly(1,2-diaminobenzene) coated platinum electrode" *Anal. Chim. Acta*, **296**: 271, 1994.
55. MAGNA, A.; CAPELATO, M. D.; FATIBELLO-FILHO, O.; "Glucose electrode based on immobilized glucose oxidase on a tungsten-tungsten oxide electrode". *J. Braz. Chem. Soc.*, **4**(2): 72, 1993.
56. LAESPADA, M. E. F.; PAVÓN, J. L. P.; CORDERO, B. M.; "Electroluminescent detection of enzymatically generated hydrogen peroxide". *Anal. Chim. Acta*, 327: 253, 1996.
57. MIN, R. W.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; "On-line monitoring of glucose and penicillin by sequential injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, 320: 199, 1996.
58. MILARDOVIC, S.; KRUHAK, I.; IVEKOVIC, D.; RUMENJAK, V.; TKALCEC, M.; GRABARIC, B. S. "Glucose determination in blood samples using flow injection analysis and an amperométrico biosensor based on glucose oxidase immobilized on hexacyanoferrate modified nickel electrode". *Anal. Chim. Acta*, **350**: 91, 1997.
59. QIN, W.; ZHANG, Z.; LI, B.; LIU, S.; "Chemiluminescence flow-sensing system for hydrogen peroxide with immobilized reagents". *Anal. Chim. Acta*, **372**: 357, 1998.
60. CHEN, M.; CAI, W. P.; ZHU, Q. Z.; WANG, X. S.; XU, J. G. "Determination of glucose based on the effect of photons as a substitute for glucose oxidase". *Anal. Chim. Acta*, **388**:11, 1999.
61. ZHANG, Z.; LV, Y.; CHEN, F.; "Chemiluminescence microfluidic system sensor on a chip for determination of glucose in human serum with immobilized reagents". *Talanta*, **59**: 571, 2003.
62. LABORLAB Diagnósticos. *Glicose PAP Liquiform*, cat. 02200, SP – BR. 2003.
63. MILLER, J.C.; MILLER, J.N. *Estatística para Química Analítica*. 2a ed. USA, Addison-Wesley Iberoamerican, S.A., 1993, 210p.

64. BURTIS, C. A.; ASHWOOD E. R. *Textbook of Clinical Chemistry*. 2a ed. USA, Saunders Comp., 1994. 2326p.
65. ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S. G.; RICHMOND, W.; FU, P. C.; "Enzymatic determination of total serum cholesterol". *Clin. Chem.*, **20**: 470, 1974
66. HUANG, H. S.; KUAN, S. S.; GUIBAULT, G. G. "Amperometric determination of total cholesterol in serum, with use of immobilized cholesterol ester hydrolase and cholesterol oxidase". *Clin. Chem.*, **23**: 671, 1977.
67. HAHN, Y.; OLSON, C. L. "Amperometric enzymatic determination of total cholesterol in human serum with tubular carbon electrodes". *Anal. Chem.*, **51**: 443, 1979.
68. TABATA, M.; ENDO, J.; MURACHI, T.; "Automated analysis of total cholesterol in serum using coimmobilized cholesterol ester hydrolase and cholesterol oxidase". *J. Appl. Biochem.*, **3**: 84, 1981
69. YAO, T.; WASA, T.; "Flow-injection system for simultaneous assay of free and total cholesterol in blood serum by use of immobilized enzymes". *Anal. Chim. Acta*, **207**: 319, 1988.
70. KRUG, A.; GOBEL, R.; KELLNER, R.; "Flow-injection analysis for total cholesterol with photometric detection". *Anal. Chim. Acta*, **287**: 59, 1994.
71. SASAMOTO, H.; MAEDA, M.; TSUJI, A.; "Chemiluminescent enzymatic assay for cholesterol in serum using lucigenin". *Anal. Chim. Acta*, **310**: 347, 1995.
72. NABI, A.; RASHID, A.; YAQOOB, M.; "Chemiluminescent determination of cholesterol by flow injection analysis with immobilized cholesterol oxidase". *Anal. Lett.*, **29**: 2281, 1996.
73. SITUMORANG, M.; ALEXANDER, P. W.; HIBBERT, D. B. "Flow injection potentiometry for enzymatic assay of cholesterol with a tungsten electrode sensor". *Talanta*, **49**: 639, 1999
74. MALIK, V.; PUNDIR, C. S. "Determination of total cholesterol in serum by cholesterol esterase and cholesterol oxidase immobilized and co-immobilized on to arylamine glass". *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **35**: 191, 2002
75. ARAUJO, A. N.; CATITA, J. A. M.; LIMA, J. L.F.C. " Monosegmented flow analysis of serum cholesterol." *IL Farmaco*, **54**, 51, 1999.
76. PIRES, C. K.; REIS, B. F.; GALHARDO, C. X.; MARTELLI, P. B. "A multicommutated flow Procedure for the determination of cholesterol in animal blood serum by chemiluminescence". *Anal. Lett.*, **36(14)**: 3011, 2003.

77. HARTREE, E. S. "Determination of protein: a modification of Lowry methods that gives a linear photometric response". *Anal. Biochem.*, **48**: 422, 1972.
78. PASIN, G.; SMITH, G. M.; O'MAHONY, M. "Rapid determination of total cholesterol in egg yolk using commercial diagnostic cholesterol reagent", *Food Chem.*, **61**, 255, 1998.
79. NOGUEIRA, G.C.; BRAGAGNOLO, N.; "Assessment of methodology for the enzymatic assay of cholesterol in egg noodles" *Food Chem*, **79**, 267, 2002.
80. LABTEST Diagnóstica. *Coolesterol Liquiform*, cat. 76-2/100, MG – BR. 2004.
81. EVERSE, J. EVERSE, K. E.; GRISHAM, M.B. *Peroxidases in Chemistry and Biology*, CRC Press. 1990, p 25-50.
82. LEON J. C.; ALPEEVA, I. S.; CHUBAR, T. A.; GLAEV, I. YU.; SAKHAROV I. YU. "Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers" *Plant Sci*, **163**:1011, 2002.
83. FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C.; "Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática" *Quim Nova*, **25**, 2002.
84. LOPEZ-SERRANO, M.; BARCELÓ, A. ROS. "Purification and characterization of a basic peroxidase isoenzyme from strawberries" *Food Chem*, **55(2)**, 133-137, 1996.
85. BRADFORD, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Anal. Biochem.*: **72**, 248, 1976.
86. SAID S.; PIETRO, R. *Enzimas de interesse industrial e biotecnológico*. Ed. Eventos, Rio de Janeiro, 2002, 121p.
87. MELLING, J.; PHILLIPS, B.W. *Large Scale extraction and purification of enzymes*, Cap. 4 In: *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Ed. Wiseman A. Ellis Horwood Limited, p. 59-83, 1986.
88. DEKKER, R. F.H.; LING, K. Y.; BARBOSA, A. M. "A simple method for monitoring chromatography column eluates for laccase activity during enzyme purification" *Biotechnology Letters*, **22**: 105, 2000.

APÊNDICE

**PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO E PRÉ-PURIFICAÇÃO
DA ENZIMA PEROXIDASE (CATALISADOR DA REAÇÃO
QUIMILUMINESCENTE)**

A1. Introdução

A peroxidase constitui uma classe de enzimas que está extensamente distribuída nas plantas e pode ser facilmente extraída das células de alguns vegetais. A participação da peroxidase em vários processos fisiológicos tem sido evidenciada, mostrando que esta enzima possui um papel importante no metabolismo. Uma função muito importante no metabolismo, atribuída a peroxidase, é a síntese da lignina. Além da lignificação, a peroxidase participa do catabolismo do ácido indol-3-acético e na biossíntese do etileno, hormônios reguladores do desenvolvimento e crescimento da planta.⁸¹

O mecanismo da reação catalisada pela peroxidase tem sido amplamente estudado, empregando-se a peroxidase proveniente da Horseradish-root (HRP), popularmente conhecida como raiz forte. A peroxidase da raiz forte possui uma massa molar de 42 kDa, é uma hemoproteína cujo grupo protético, a ferroprotoporfirina IX, está ligada covalentemente a parte protéica da molécula. Atribui-se a atividade catalítica da enzima, ao grupo prostético, onde no centro o ferro (II) está coordenado com um resíduo de histidina próximo na quinta posição e, um resíduo de histidina, longe do centro associado a uma molécula de água.⁸¹

A peroxidase catalisa a reação de oxidação de uma variedade de substratos orgânicos. A catálise destes compostos inicia-se pela oxidação do grupo protético da enzima pela ação do peróxido de hidrogênio ou de um hidroperóxido orgânico disponível no meio.⁸² Existe um grande interesse por esta enzima, devido as suas múltiplas aplicações, na indústria de papel e celulose, de alimentos, análises bioquímicas, etc. Atualmente cerca de 70% dos Kits de análises imunoenzimáticas são preparados empregando esta enzima. A peroxidase se encontra amplamente distribuída nas plantas, mas a peroxidase de raiz forte ou silvestre é a mais utilizada, devido a atividade dessa enzima ser maior (10 a 100 vezes) quando comparada com peroxidases de outras fontes. A peroxidase de plantas tropicais tem sido pouco estudada. Segundo Fatibello e Viera⁸³ “O Brasil possui uma natureza rica e, portanto, torna-se uma fonte inesgotável de enzimas, que podem ser aplicadas em diversas áreas do conhecimento”. O objetivo inicial deste trabalho consistiu em avaliar a atividade da peroxidase de algumas fontes vegetais e obtê-la na forma pré-purificada para ser

empregada como catalisador, em especial da reação quimiluminescente do luminol e peróxido de hidrogênio. Nos estudos de pré-purificação também foi monitorada a atividade da polifenol oxidase (PFO), pois como essas enzimas possuem massas molares próximas (peroxidase de 40 a 65 kDa e polifenol oxidase de 57 a 62 KDa) estão conjuntamente presentes nos vegetais, e do interesse no emprego destas enzimas em trabalhos futuros para desenvolvimento de procedimentos analíticos.

A2. Experimental

A2.1 – Equipamentos e acessórios

Os vegetais empregados como fontes enzimáticas de peroxidase (batata doce (*Ipomoea batatas L.Lam*) e abobrinha, (*Cucúrbita pepo*)) foram homogeneizados em um liquidificador Firenze da Walita (RI6755) e filtrados em um funil de vidro empregando algodão hidrofílico

O homogenato vegetal foi centrifugado em uma centrífuga Du Pont Instruments Sorvael, modelo RC-5B, provida de rotor SS-34 com diâmetro de 23 cm.

As medidas de absorvância para a determinação de proteínas totais e medidas da atividade foram realizadas em um espectrofotômetro com arranjo linear de diodos da Hewlett Packard (HP), modelo 8452 A, acoplado a um microcomputador modelo 28/12 e uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm.

Para o controle da temperatura, utilizou-se uma célula de vidro de 15 mL com camisa para a circulação de água de um banho termostático da Tecnal, modelo TE 184.

Para o ajuste do pH das soluções preparadas, utilizou-se um pH-metro da Orion, modelo EA 940 contendo um eletrodo de vidro combinado da Ingold, modelo 10/402/3092.

A coluna cromatográfica foi construída empregando uma coluna de vidro de 70 cm x 2,5 cm, contendo como fase de separação Sephadex G-100.

Nos procedimentos de purificação, as frações foram recolhidas empregando um coletor de frações da Advantec, modelo SF-2120.

A.2.2 Reagentes e soluções

A solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) empregada no primeiro procedimento de extração foi preparada dissolvendo-se 1,7814 g de Na_2HPO_4 (Cinética química) e 3,1773 g de KH_2PO_4 (Cinética química) em 500 mL de água desionizada.

A polivinilpirrolidona (PVP), empregada no primeiro procedimento de extração, é comercialmente conhecida como Polyclar SB 100 e foi produzida e doada pela empresa ISP Technologies Inc.

A solução tampão fosfato (pH 6,5) em concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido ascórbico e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de EDTA, empregada no segundo procedimento de extração, foi preparada dissolvendo-se 1,7809g de Na_2HPO_4 e 3,1770g de KH_2PO_4 em 300 mL de água desionizada. Após a solubilização dos sais, adicionou-se 0,4409 g de ácido ascórbico (Carlo Erba) e 0,7297g de EDTA sódico (Riedel-deHaën) e completou-se o volume para 500 mL com água desionizada.

O sulfato de amônio, empregado na precipitação das enzimas era procedente da marca J.T.Baker.

A solução de guaiacol $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, utilizada para a determinação da atividade da peroxidase, foi preparada a partir da diluição de 0,632 mg deste reagente (Merck; $d=1,1287 \text{ g L}^{-1}$; 98%) em 100 mL de água desionizada.

A solução de peróxido de hidrogênio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, utilizada para a determinação da atividade da peroxidase, foi preparada pela diluição de 100 μL deste reagente (Reagen, 31% m/m) em 100 ml de água desionizada, sendo padronizada com uma solução de permanganato de potássio previamente padronizada.

A solução de catecol $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, utilizada para a determinação da atividade da polifenol oxidase, foi preparada dissolvendo-se a massa de 0,5502g desse reagente (Aldrich) em 100 mL de água desionizada.

A solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) empregada na determinação das atividades enzimáticas, foi preparada dissolvendo-se 1,7812g de Na_2HPO_4 e 3,1761g de KH_2PO_4 em 500 mL de água desionizada.

A solução tampão fosfato $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 6,0), empregada no procedimento de diálise e fase móvel da coluna cromatográfica, foi preparada dissolvendo-se 0,400 g de Na_2HPO_4 (Cinética química) e 1,840 g de KH_2PO_4 (Cinética química) em 2000 mL de água desionizada.

O gel (Sephadex G-100, permite a separação de proteínas por exclusão molecular de 30 a 80 kDalton empregado na preparação da coluna cromatográfica foi preparado da seguinte forma: A 35,0 g de Sephadex G-100 foram adicionados 700,00 mL de solução tampão fosfato $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 6,0), a mistura após homogeneizada foi mantida em repouso durante 12 horas, no qual observa-se a formação de um gel. Cada grama de Sephadex adsorveu aproximadamente 18,00 mL de solução tampão fosfato. A coluna de vidro (70 cm x 2,5 cm) foi então preenchida com aproximadamente 500,00 mL do gel formado.

O sulfato de amônio empregado na precipitação das enzimas era procedente da marca J.T.Baker.

A2.3 – Procedimento Experimental

A2.3.1. Obtenção do extrato bruto enzimático

Os estudos realizados para avaliar as metodologias de extração foram feitos em duplicata.

Na primeira metodologia (EM1)⁸⁴, aproximadamente 10,0 g do vegetal (abobrinha, batata doce, batata inglesa, pepino japonês e raiz forte), foram picados em pedaços menores e homogeneizados em um liquidificador com 100 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5), contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido ascórbico e 5 mmol L^{-1} de EDTA por 3 minutos. Em seguida, o homogenato foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a $25000 \times g$ (18000 r.p.m.) durante 15 minutos, a 4°C . A solução sobrenadante foi então separada em alíquotas de 10 mL. Para precipitar as proteínas, adicionou-se sulfato de amônio (8,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para cada 10 mL de solução sobrenadante (85% de saturação) e a solução mantida a 4°C . Após 1h, o precipitado formado foi

separado do sobrenadante por centrifugação 25000xg (10 min). O precipitado formado foi então ressuspenso (dissolvido) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5) e empregado nas determinações da atividade enzimática da peroxidase e polifenol oxidase.

Na segunda metodologia (EM2)⁸³, aproximadamente 10,0 g do vegetal (abobrinha, batata doce, batata inglesa, pepino japonês e raiz forte), foram picados em pedaços menores e homogeneizado em um liquidificador com 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5), contendo 2,5 g de polivinilpirrolidona (PVP) por 3 minutos. Em seguida o homogenato, foi filtrado em quatro camadas de gazes e centrifugado a 25000xg (18000 r.p.m.) durante 15 minutos, a 4°C. A solução sobrenadante foi então separada em alíquotas de 10 mL. Para precipitar as proteínas, adicionou-se sulfato de amônio (8,5 g de (NH₄)₂SO₄ para cada 10 mL de solução sobrenadante, (85% de saturação) e a solução mantida a 4°C. Após 1 h, o precipitado formado foi separado do sobrenadante por centrifugação 25000xg (10min). O precipitado formado foi então ressuspenso (dissolvido) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5) e empregado nas determinações da atividade enzimática da peroxidase e polifenol oxidase.

Foram realizadas também extrações (extração de referência (ER)) empregando somente a solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5), (na ausência de ácido ascórbico, EDTA e polivinilpirrolidona).

A2.3.2 Determinação da atividade da peroxidase

A atividade da peroxidase presente no extrato bruto foi determinada utilizando o guaiacol como substrato. Em uma alíquota de 1,0 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5) foi adicionado 1,0 mL de guaiacol 50,0 mmol L⁻¹ e 1 mL de peróxido de hidrogênio 15 mmol L⁻¹. Após homogeneização dessa solução, adicionaram-se 50 µL de extrato enzimático. A reação se processou durante 3 minutos a 30 °C e a absorbância foi medida em 470 nm. Foram realizados controles (brancos) do substrato e da enzima, para verificar se estes não absorviam no mesmo comprimento de onda do produto de oxidação (tetraguaiacol) formado.

Para o cálculo da atividade enzimática, Unidades mL⁻¹, foi empregada a equação A1.

$$\text{Unidades (mL}^{-1}\text{)} = \frac{A}{\epsilon} \times \frac{1}{V_e} \times FD \times \frac{1}{t} \times 4 \times 1000 \quad (\text{eq.A1})$$

Onde:

A = absorvância

ϵ = absorvidade molar (M⁻¹ cm⁻¹) (26.600 M⁻¹ cm⁻¹ para o tetraguaiacol)

V_e = volume da solução de enzima utilizada no ensaio (mL)

t = tempo de reação (segundos)

FD = fator de diluição (diluição do extrato bruto enzimático)

Uma unidade da atividade da peroxidase representa a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de guaiacol em 1 minuto.

A2.3.3 Determinação da atividade da polifenol oxidase

A atividade da polifenol oxidase presente nos vegetais foi determinada pela medida da absorvância em 410 nm, durante 2 minutos, da o-quinona formada na reação entre 2,8 mL da solução de catecol 50,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5) e 0,2 mL da solução sobrenadante, contendo o extrato bruto. Foram realizados controles (brancos) do substrato e da enzima, para verificar se estes não absorviam no mesmo comprimento de onda do produto de oxidação (o-quinona) formado.

Uma Unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorvancia por minuto nas condições mencionadas. Para o cálculo da atividade da PFO foi utilizada a equação A2.

$$A = \frac{\Delta \text{Abs} \times 60 \times 1000}{\Delta t \times V} \quad (\text{eq.A2})$$

Onde:

A = atividade da enzima (unidades mL⁻¹)

ΔAbs = variação da absorvância (410 nm)

Δt = variação do tempo (segundos)

V = volume da amostra (mL)

A2.3.4 Determinação da quantidade de proteínas totais

As quantificações das proteínas totais nos extratos foram realizadas empregando-se a metodologia descrita por Bradford M. M.⁸⁵ Para a obtenção da curva analítica 1,0 mL das soluções padrões de proteínas (10 a 100 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionadas a 4,0 mL da solução do reagente (Comassie blue). Após 5 minutos de reação, a absorvância do complexo formado era medida espectrofotometricamente em 588 nm.

A.2.3.5 Precipitação das proteínas (pré-concentração)

Inicialmente foram realizados estudos preliminares da precipitação das proteínas na presença de diferentes concentrações de saturação de sulfato de amônio. Em alíquotas de 5,0 mL do extrato foi adicionado sulfato de amônio até se obter as porcentagens de saturação de 40%, 60%, 80%, 85% e 90%. A solução foi mantida a 4°C, durante 15 h. A seguir, o precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação a 3000 rpm, por 5 min. Foram monitoradas as atividades da enzima nas soluções dos extratos e nos sobrenadantes obtidos, nas respectivas saturações.

A partir dos estudos preliminares, realizou-se a precipitação das proteínas em 360 mL da solução de extrato bruto, em duas etapas. Na primeira etapa, ao extrato foram adicionados 144 g de sulfato de amônio (40% de saturação), a solução foi mantida a 4°C por aproximadamente 15 h. A seguir, o sobrenadante foi separado do precipitado por centrifugação a 3000 rpm, durante 5

min. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante, adicionou-se mais 162 g de sulfato de amônio (85% de saturação), a solução foi mantida a 4°C, por aproximadamente 15 h. Novamente o sobrenadante foi separado do precipitado por centrifugação a 3000 rpm, durante 5 min; entretanto desta vez, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (concentrado de proteínas) foi ressuspensionado em 10,0 mL de uma solução tampão fosfato 5,0 mmol L⁻¹ (pH 6,0)

A2.3.6 Diálise

Após a pré-concentração do extrato (precipitação com sulfato de amônio), o material foi ressuspensionado em 10 mL de solução tampão fosfato 5,0 mmol L⁻¹. Esta solução foi acondicionada num saco de diálise, e o material dialisado durante 8 horas contra 200 mL de uma solução de tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 6,0) a 4 °C. A solução tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ empregada na diálise, era trocada em intervalos de 1 hora, durante 8 horas.

A2.3.7 Separação cromatográfica por exclusão molecular Sephadex G-100

Após a diálise, 7,0 mL do extrato concentrado foi aplicado na coluna. A eluição na coluna foi realizada empregando-se tampão fosfato 10,0 mmol L⁻¹ (pH 6,0) numa vazão de 15 mL/h. As frações de 5,0 mL foram coletadas em tubos de ensaio, empregando o coletor de frações automatizado, e nestas frações foram monitoradas as quantidades de proteínas, medidas realizadas no UV (280 nm) e medida a atividade (U/mL). Porém, antes da medida da atividade da peroxidase nas frações, foi realizado um “screening” afim de se verificar quais frações se observava a presença desta enzima.

A2.3.7.1. Avaliação rápida da presença da peroxidase nos extratos provenientes do procedimento de purificação (“screening”)

Em papéis de filtro Whatman nº1 de 8 cm de diâmetro, foram riscados quadrados de 1cm x 1 cm com o auxílio de uma caneta preta de ponta fina. Cada quadrado foi numerado e representava a respectiva fração eluída. No

centro de cada quadrado foram adicionados, com o auxílio de uma micropipeta, 5,0 μL de uma solução tampão fosfato 10,0 mmol L^{-1} contendo guaicol 15,0 mmol L^{-1} e peróxido de hidrogênio 3,0 mmol L^{-1} . Em seguida, 5,0 μL das frações eram adicionadas nos respectivos quadrados e esperava-se 3 min de reação. A presença positiva da peroxidase era evidenciada pelo aparecimento de uma coloração alaranjada. A Figura A1 apresenta o papel de filtro quadriculado, e numerado, representado as respectivas frações. Este procedimento foi realizado com as 138 frações coletadas da coluna. Posteriormente, nas frações que apontavam a presença da peroxidase, a sua atividade foi determinada empregando-se a metodologia descrita no item A.2.3.2.

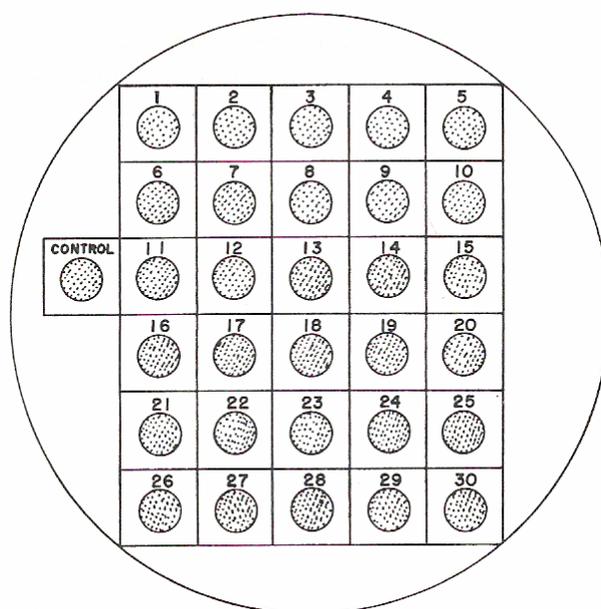


Figura A1 – Papel de filtro Whatman nº 1 quadriculado (1cm x 1cm) e numerado, empregado no “screening” para verificar a presença da atividade da peroxidase nas respectivas frações.

5.3 - Resultados e Discussão

A Figura A2 apresenta as atividades da peroxidase obtidas, empregando-se as metodologias de extração ER, EM1 e EM2.

Dos vegetais estudados (abobrina, batata doce, batata inglesa, pepino japonês e raiz forte) o extrato da batata inglesa e do pepino japonês não apresentaram atividade da enzima peroxidase.

A maior atividade enzimática da POD foi obtida no extrato da raiz forte (3,56 U mL⁻¹), seguida da abobrinha (1,20 U mL⁻¹) e da batata doce (0,85 U mL⁻¹). Entretanto, a disponibilidade da raiz forte, apesar de algumas plantações no sudeste, é pequena, quando comparada com a abobrinha.

As extrações da peroxidase, empregando as metodologias EM1 e EM2, apresentaram sempre melhores resultados que aquelas realizadas somente em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (ER), pH 6,5. Extrações realizadas com a abobrinha e batata doce empregando as metodologias EM1 e EM2 apresentaram praticamente a mesma atividade de peroxidase. Para a raiz forte, a maior atividade enzimática foi obtida com extrações realizadas empregando-se a metodologia EM2.

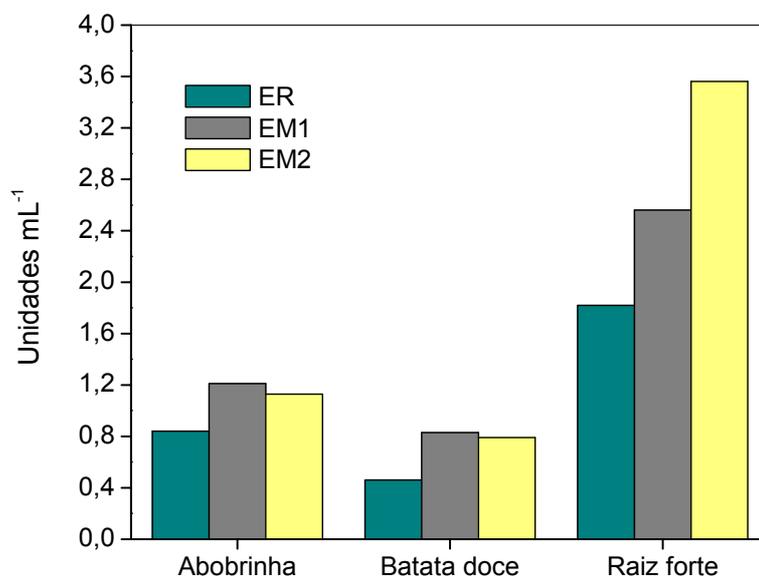


Figura A2 – Atividade da peroxidase POD (Unidades mL⁻¹) dos extratos de abobrinha, batata doce e raiz forte obtidos empregando-se diferentes métodos de extração ER, EM1 e EM2, respectivamente.

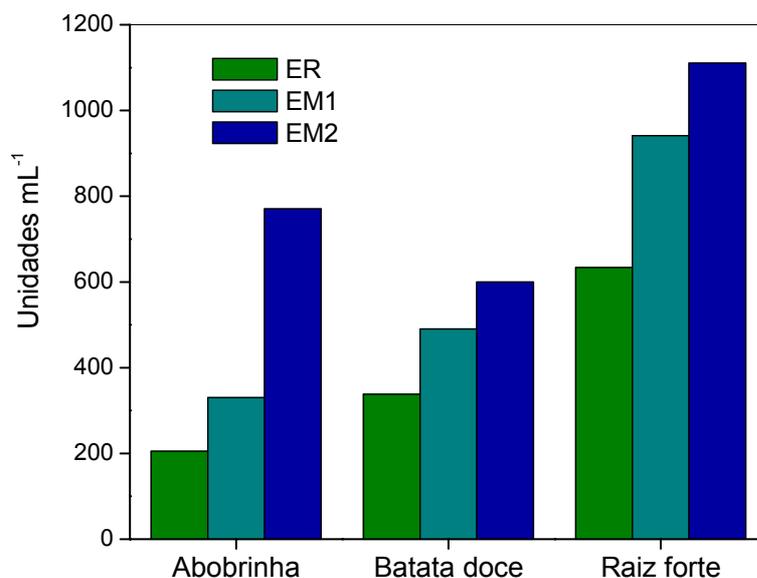


Figura A3 – Atividade da polifenol oxidase PFO (Unidades mL⁻¹) dos extratos de abobrinha, batata doce e raiz forte utilizando de diferentes métodos de extração ER, EM1 e EM2.

A Figura A3 apresenta a atividade da polifenol oxidase obtida, empregando-se as metodologias de extração ER, EM1 e EM2.

Todos os vegetais estudados (abobrinha, batata doce e raiz forte) apresentaram atividade da polifenol oxidase. As atividades foram mais significativas quando os extratos foram obtidos com a metodologia de extração EM2.

Definido o melhor procedimento de extração, iniciou-se o procedimento de pré-purificação da enzima peroxidase. A batata doce foi o vegetal escolhido para os estudos, empregando-se a metodologia de extração EM2.

A precipitação de proteínas empregando concentrações crescentes de sais é uma prática muito utilizada em laboratórios de bioquímica para atender tanto a proposta de purificação, quanto a de concentração de uma proteína específica. O sal mais comumente empregado é o sulfato de amônio, devido a sua alta solubilidade, apresentar baixa toxicidade a maioria das enzimas, custo baixo e, em alguns casos, pelo efeito estabilizante sobre as enzimas⁸⁶ A Figura A4 apresenta os estudos preliminares para a precipitação da peroxidase, obtida da batata doce, com concentrações crescentes de sulfato de amônio (m/V).

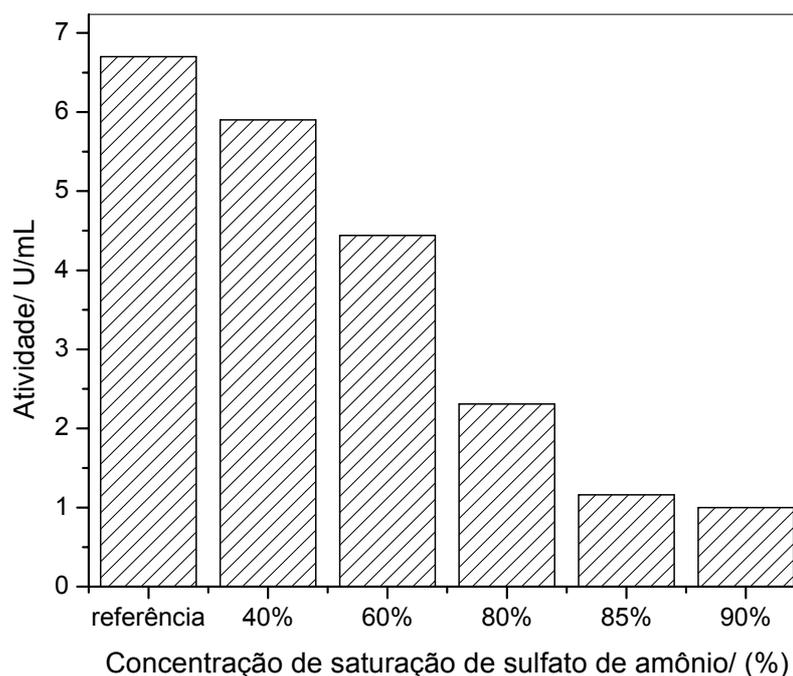


Figura A4 – Precipitação da enzima peroxidase, obtida do extrato da batata doce em diferentes (%) de saturação com sulfato de amônio.

O procedimento de extração de enzimas, rompimento da célula, expõe o seu conteúdo citoplasmático e nucléico, juntamente com as enzimas intracelulares⁸⁶. Estes compostos são indesejáveis e considerados contaminantes. Há, portanto, interesse em extraí-los da mistura sem que ocorra perda da atividade enzimática. No estudo preliminar realizado para a precipitação de proteínas, observa-se que com o aumento da concentração de sulfato de amônio verifica-se a diminuição da atividade enzimática no sobrenadante. Nas concentrações de 85 a 90% de saturação, a atividade da peroxidase no sobrenadante, diminuiu ca. 85%, quando comparada com a atividade inicial da enzima no extrato (referência), sugerindo que praticamente quase toda a peroxidase foi precipitada. Um outro dado relevante que não pode ser observado no gráfico, é que a partir de 40% de saturação, ocorre a formação significativa de um precipitado e, conseqüentemente uma clarificação da solução de extrato, proveniente da precipitação dos materiais citoplasmáticos e nucleares e/ou proteínas presentes. Nesta porcentagem de saturação, não há uma diminuição significativa da atividade (apenas 11% da atividade inicial). Portanto, nos estudos

posteriores, a precipitação e/ou pré-concentração da peroxidase foram realizadas em duas etapas, inicialmente com 40% de saturação, a fim de se eliminar vários compostos e/ou proteínas indesejáveis, além da clarificação do extrato. Após esta etapa a mesma solução de extrato foi então submetida a uma precipitação com 85% de saturação com sulfato de amônio, por 15 h, a 4°C. O precipitado formado é separado e ressuspendido em 10,0 mL de solução tampão fosfato 5,0 mmol L⁻¹. O material é então dialisado, conforme procedimento descrito no item A2.3.6, a fim de se retirar o excesso de sal, para posteriormente ser empregado na cromatografia em gel.

O procedimento de cromatografia em gel é também conhecido como gel filtração, filtração molecular, cromatografia molecular, cromatografia de exclusão, etc. A partir de 1959, uma série de géis foram desenvolvidos sob a denominação de Sephadex.⁸⁷ O dextrano é um polissacarídeo de glicose solúvel produzido pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*. Outros géis usados neste tipo de cromatografia incluem os géis de poli(acrilamida) (bio-gel), géis de agar e agarose (Sephacrose e Bio-gel) e Sephacryl, que é uma combinação de dextrano e poli(acrilamida). O mecanismo de cromatografia em gel pode ser mais facilmente entendido, considerando-se o gel como uma estrutura porosa na forma de “beads” (esferas). As proteínas de menor massa molar passam por dentro dos poros enquanto aquelas de maior massa molar, percolam mais rapidamente pelo lado de fora das esferas. Assim, no processo de separação das proteínas, aquelas com maiores massas molares são eluídas mais rapidamente, enquanto as proteínas menores, no caso da proteína alvo, saem posteriormente. Portanto, a escolha da porosidade do gel, varia em função da massa molar da enzima de interesse.

No procedimento de purificação da peroxidase foi empregado a Sephadex G-100 (30 a 80 kD). Uma alíquota de 5,0 mL da solução dialisada foi eluída no sistema cromatográfico montado, apresentado na Figura A5.



Figura A5 – Sistema cromatográfico para purificação de enzimas, constituído de coletor de frações e coluna cromatográfica contendo gel Sephadex G-100.

Um total de 138 frações foram coletadas da coluna cromatográfica. O acompanhamento da eluição das proteínas foi realizada pela medida de absorbância, em 288 nm, nas frações coletadas. Obtido o perfil de separação das proteínas, iniciou-se então um “screening” das frações para verificar quais apresentavam a presença da atividade da enzima peroxidase. Neste trabalho, empregou-se uma técnica que permite a visualização rápida da presença de uma enzima, quando esta reage com um substrato específico, e o produto da reação é um composto colorido. Ela é muito utilizada em eletroforese, empregando gel de poliacrilamida como suporte, para a identificação de enzimas específicas. Dekker *et al.*⁸⁸, propuseram a utilização do papel de filtro como suporte para visualização rápida da enzima, no trabalho de purificação da enzima lacase produzida pelo fungo *Botryosphaeria sp.* O procedimento do “screening” está descrito com mais detalhes no item A2.3.7.1.

Utilizando-se esta técnica, diminui-se o tempo e o trabalho que seria empregado para a medida da atividade em todas as frações, além de um significativo consumo dos reagentes que seriam empregados na medida da atividade, pois a atividade foi determinada somente naquelas frações que haviam

indicado a presença da enzima. Entretanto, alguns cuidados devem ser tomados quando empregada esta técnica para análise da peroxidase. Verificou-se que quando havia a presença da enzima na fração, a reação ocorria e conseqüentemente uma coloração alaranjada aparecida num intervalo de até 3 minutos e, após este tempo a coloração alaranjada ia desaparecendo. Portanto, é recomendável que se analise um conjunto de 15 frações por vez.

A Figura A6 apresenta os resultados obtidos no monitoramento das proteínas medidas em 288 nm e a determinação da atividade da peroxidase (U/mL).

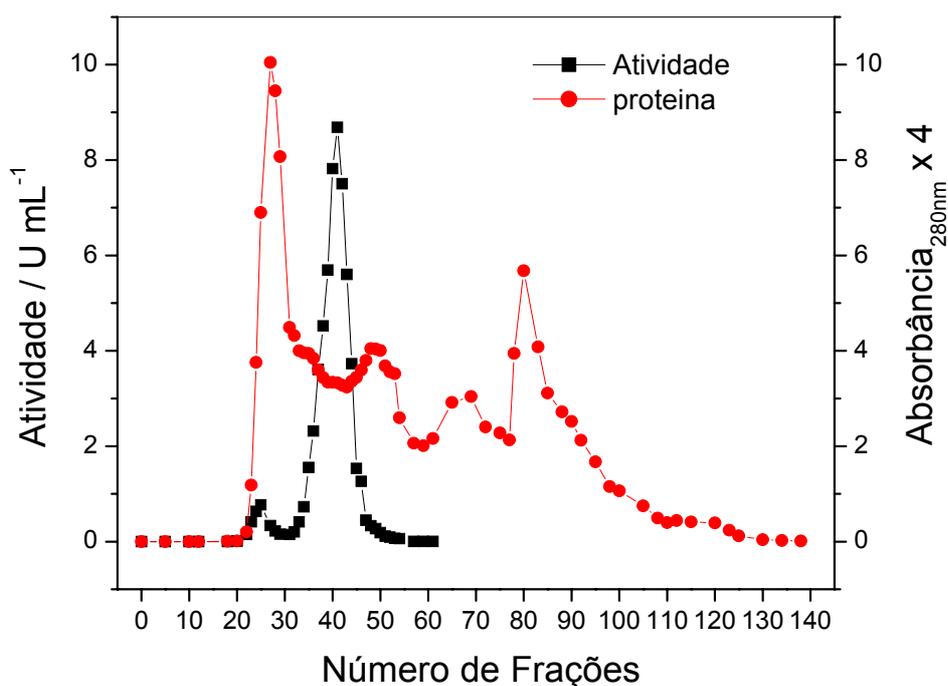


Figura A6 – Fracionamento da peroxidase da batata doce em gel (Sephadex G-100 (2,5 x 70 cm)): Volume das frações de 5,0 mL; ■ monitoramento da peroxidase (U/ mL); ● monitoramento das proteínas (absorvância 280 nm).

Observa-se na Figura A.6 que a peroxidase foi eluída primeiramente entre as frações 21 a 28 e, posteriormente entre as frações 34 a 50. Neste último conjunto de frações, determinou-se a concentração de proteínas totais, pelo

método de Bradford. que apresentou um valor médio de 36,0 µg/mL. Entre as frações 51 a 138 a peroxidase não apresentou atividade enzimática. A separação da peroxidase de outras proteínas e/ou substâncias com massas moleculares distintas, pôde ser evidenciado pelo monitoramento das proteínas em 280 nm. A Tabela A.1 apresenta os resultados obtidos nos procedimentos de pré-purificação da peroxidase, obtida da batata doce.

TABELA A1 – Perfil de purificação da enzima peroxidase obtida da batata doce, nas diferentes etapas estudadas

Etapa	Atividade T. (U)	Proteínas T (mg)	Atividade Esp. (U/mg de pro.)	Fator de purificação
Extrato bruto	595,49	262,96	2,26	1,0
Após ppt 85%	221,43			
Saturação (NH ₄) ₂ SO ₄		16,93	13,08	5,79
Sephadex G-100	55,80	2,88	19,37	8,57

Ao final do processo de pré-purificação, obteve-se um fator de purificação da enzima de 8,57 vezes. As frações que apresentaram atividade de peroxidase (34 a 50) foram então misturas e liofilizadas. Posteriormente, foi empregada como catalisador, nos estudos preliminares da reação quimiluminescente, apresentada no capítulo 2, item 2.4.3.

A4. Considerações finais

Inicialmente o objetivo do projeto era o emprego da peroxidase como catalisador da reação quimiluminescente. Entretanto, nos estudos da avaliação da eficiência da catálise, verificou-se que num primeiro momento, o melhor catalisador para as condições desse trabalho foi o hexacianoferrato (III) de potássio. Os estudos de purificação, porem prosseguiram em razão do grupo de pesquisa empregar as enzimas (polifenol oxidase e peroxidase) para a construção de biossensores e/ou como reagente em procedimentos analíticos em fluxo. Neste sentido, algumas parcerias com outros laboratórios também foram estabelecidas, sendo que o extrato bruto da peroxidase da raiz forte foi empregado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Auro A. Tanaka da Universidade Federal do Maranhão – UFMA, para o trabalho de mestrado do aluno Iranaldo Santos da Silva na “Avaliação do extrato bruto de raiz forte na elaboração de um biossensor amperométrico para determinação de compostos fenólicos”. Outra parceria estabelecida com o grupo de pesquisa da Professora Débora Gonçalves, Departamento de Física da USP-São Carlos, no qual o aluno de doutorado Mauricio Foschini está imobilizando o extrato bruto pré-purificado, como fonte de polifenol oxidase, em filmes poliméricos condutores (polipirrol) para detecção de compostos fenólicos,

Atualmente, as alunas de iniciação científica Daniela A. Vieira (bolsa PIBiC) e Ana Elisa Zeraik (projeto Fapesp nº 05/00647-8), estão dando continuidade aos trabalhos de extração e purificação das enzimas peroxidase e polifenol oxidases, de algumas fontes vegetais.

