

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

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS AUTOMÁTICOS PARA
A DETERMINAÇÃO DE 3-HIDROXIBUTIRATO, GLICOSE E
COLESTEROL EM SORO DE SANGUE ANIMAL EMPREGANDO
MULTICOMUTAÇÃO EM FLUXO**

CHERRINE KELCE PIRES*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis

*bolsista da CAPES

SÃO CARLOS – SP

2003

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

P667dp

Pires, Cherrine Kelce.

Desenvolvimento de procedimentos automáticos para a determinação de 3-hidroxiacetato, glicose e colesterol em soro de sangue animal empregando multicomutação em fluxo / Cherrine Kelce Pires . -- São Carlos : UFSCar, 2003.

126 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Química analítica. 2. Análise por injeção em fluxo. 3. Multicomutação. 4. Soro sanguíneo. 5. Parâmetros metabólicos. I. Título.

CDD: 543 (20^a)

“Uma mente que se abre para uma nova idéia,
jamais retornará ao seu tamanho original”.
(Albert Einstein)

À Deus por todos os momentos da minha vida
À minha querida família, especialmente meus
pais Geraldo e Hildeth, e meus irmãos Mário,
Marlon e Luziane pelo amor, incentivo, apoio
e confiança nesta jornada
À minha saudosa avó Orieta

Dedico este trabalho

Agradecimentos

À Universidade Federal de São Carlos e ao programa de Pós-graduação em Química, pela oportunidade oferecida;

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, particularmente ao Laboratório de Química Analítica "Henrique Bergamin Filho", pela concessão de equipamentos e infra-estrutura para a execução de toda a parte experimental;

Ao Departamento de Nutrição Animal (CENA/USP) e ao Departamento de Zootecnia (ESALQ/USP) pelas amostras concedidas;

À CAPES, FAPESP, CNPq/PRONEX pelo apoio financeiro concedido;

Ao admirado professor Boaventura, pela orientação e confiança no desenvolvimento da pesquisa, bem como nas discussões sobre os mais diversos assuntos;

Ao professor Efraim Lázaro Reis (UFV) pela amizade, apoio e incentivo em todos os momentos;

À professora Patrícia B. Martelli (UFSJ) pela co-orientação, discussões, apoio e incentivo no desenvolvimento da pesquisa;

Ao professor Fábio R. P. Rocha (IQ, USP) pela discussão deste trabalho;

Aos professores Ana Rita A. Nogueira (EMBRAPA, São Carlos) e Orlando Fatibello Filho (DQ, UFSCar) pelas sugestões apresentadas no exame de qualificação;

Aos professores Ana Rita A. Nogueira (EMBRAPA, São Carlos), Eloísa A. M. Kronka (UNAERP), Ivan Gonçalves de Souza (UFSC) e Orlando Fatibello Filho (DQ, UFSCar) pelas discussões e sugestões apresentadas na defesa de tese;

Ao professor José L. F. C. Lima e Maria Lúcia M. F. S. Saraiva (Universidade do Porto, Portugal) pela contribuição deste trabalho;

Ao querido André pelas discussões e sugestões, além do apoio, no desenvolvimento da pesquisa, e por ouvir meus desabafos, enfim, por todos os bons momentos que passamos juntos;

À Ana Paula Gervasio e Iolanda Rufini (Tatinha) pelas sugestões apresentadas nesse trabalho;

À Sheila, pela amizade e pela paciência em todos os serviços burocráticos;

Aos laboratoristas do CENA, Fátima e Valdemir (Milão) pelos serviços prestados sempre que foi necessário;

Ao Zezinho pela eficiência e atenção aos serviços prestados, e pela simpatia cativante a cada dia;

À todos pesquisadores, alunos de pós-graduação e estagiários da Seção de Química Analítica do CENA que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho e pela agradável convivência durante estes anos;

Ao João Geraldo pelo profissionalismo na elaboração dos desenhos;

Às bibliotecárias do CENA-USP, pela atenção em todos os serviços solicitados;

Aos amigos da UFSCar;

Às secretárias Ariane, Luciani e Cristina, pela atenção;

À todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Apresentação

Neste trabalho, são propostos sistemas de análises em fluxo para as determinações de parâmetros metabólicos em soro animal usando reações enzimáticas. As reações catalisadas por enzimas vêm sendo bastante utilizadas devido a sua alta seletividade e efeito catalítico. Os módulos de análise empregam multicomutação para o gerenciamento independente das soluções, reduzindo, assim, os volumes de reagentes e de amostras, e conseqüentemente, gerando pequenos volumes no efluente.

Métodos analíticos baseados no processo de análises químicas em fluxo (FIA) apresentam, geralmente, baixo custo de implementação, rapidez na emissão dos resultados e podem ser facilmente adaptados a novos procedimentos analíticos. Assim, o emprego de tais métodos para a determinação de parâmetros metabólicos como 3-hidroxiacetato, glicose e colesterol em soro de sangue animal, apresenta-se como excelente alternativa. Os métodos utilizados para determinação dos parâmetros metabólicos são adquiridos, geralmente, como *kit*. Nesse caso, as metodologias utilizadas são manuais, o que torna os procedimentos trabalhosos e dispendiosos.

No decorrer do texto, termos em inglês são destacados em itálico. As palavras abreviadas, usualmente encontradas na literatura, são descritas na lista de abreviaturas.

Esta tese é apresentada em 6 capítulos, ordenados por assuntos e divididos em seções e sub-seções.

No Capítulo 1 é apresentado um breve histórico sobre sangue e nutrição animal. Além disso, também são abordados alguns aspectos conceituais sobre sistemas de análises em fluxo e multicomutação, quimiluminescência, enzimas, métodos de imobilização, bem como metodologias descritas na literatura. Esses aspectos são revisados e fundamentados com o auxílio de revisão bibliográfica, referente aos assuntos pertinentes ao tema da tese.

No Capítulo 2 é apresentada a revisão de literatura e descritas a parte experimental, os resultados obtidos e a discussão do procedimento proposto para a determinação espectrofotométrica de 3-hidroxiacetato.

Nos Capítulos 3 e 4 são apresentadas as revisões de literatura e descritas as partes experimentais desenvolvidas para a determinação de glicose e

de colesterol, respectivamente, por detecção quimiluminescente, com apresentação dos resultados obtidos e discussões.

No Capítulo 5 apresentam-se as conclusões gerais e sugestões para futuros trabalhos. Finalmente, no Capítulo 6 são citadas as referências bibliográficas, consultadas para a redação do trabalho.

Lista de abreviaturas

A - amostra

AMP - 5'-monofosfato de adenosina

ATP - 5'-trifosfato de adenosina

B_i - reatores tubulares helicoidais

C - solução transportadora

CE - colesterol esterase

CFA - análise em fluxo contínuo

COD - colesterol oxidase

D - descarte de soluções

DBPH - 4-(5', 6'-dimetoxibenzotiazol)ftalhidrazida

d.i. - diâmetro interno

DET - detector

E - enzima

EC - Comissão Enzimática (do inglês *Enzymatic Commission*)

EP - complexo enzima-produto

ES - complexo enzima-substrato

FIA - análise por injeção em fluxo (do inglês *flow injection analysis*)

GOD - glicose oxidase

HBDH - 3-hidroxiacetilacetato desidrogenase

HDL - lipoproteínas de alta densidade (do inglês *high-density lipoproteins*)

IUB - União Internacional de Bioquímica

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LDL - lipoproteínas de baixa densidade (do inglês *low-density lipoproteins*)

MSFA - análise em fluxo monossegmentado

NAD⁺ - dinucleotídeo adenina nicotinamida

NADH - redução de dinucleotídeo adenina nicotinamida

P - produto

POD - peroxidase

QL - quimiluminescência

R_i - reagentes

S - substrato

SIA - análise por injeção seqüencial

TCA - ácido tricloroacético

T_i - tempo de acionamento das válvulas

U - unidade padrão de enzima

V_i - válvulas solenóides

Lista de tabelas

TABELA 1.1 - Principais aplicações comuns dos sistemas quimiluminescentes.....	16
TABELA 1.2 - Exemplos de enzimas e seus valores de pH ótimo.....	22
TABELA 2.1 - Resultados obtidos na determinação de 3-hidroxiacetato em amostras ^a de soro ovino e bovino empregando o sistema proposto e o procedimento manual.....	52
TABELA 2.2 - Comparação entre o procedimento proposto e o procedimento manual.....	53
TABELA 3.1 - Influência dos volumes da amostra e reagentes sobre o sinal analítico.....	74
TABELA 3.2 - Comparação de resultados obtidos na determinação de glicose em amostras ^a de soro sanguíneo animal empregando o sistema proposto e o procedimento manual de análises.....	81
TABELA 3.3 - Comparação entre o procedimento proposto e o procedimento manual.....	82
TABELA 4.1 - Influência dos volumes dos reagentes R ₁ e R ₂ sobre o sinal analítico.....	103
TABELA 4.2 - Influência dos possíveis potenciais interferentes na determinação do colesterol total.....	108
TABELA 4.3 - Resultados obtidos na determinação de colesterol total em amostras de soro ovino e bovino empregando o sistema proposto e o procedimento manual.....	111
TABELA 4.4 - Comparação entre o procedimento proposto e o procedimento manual.....	112

Lista de figuras

FIGURA 1.1 - Composto orgânico 2,4,5-trifenilimidazol (lofina) que mostra reação quimiluminescente.....	14
FIGURA 1.2 - Esquema simplificado da reação quimiluminescente do luminol.....	14
FIGURA 1.3 - Formação do complexo enzima-substrato.....	20
FIGURA 1.4 - Formação do complexo enzima-produto e produto.....	21
FIGURA 1.5 - Reação de formação do derivado 3-aminopropiltrietoxissilano.....	25
FIGURA 2.1 - Diagrama de blocos do sistema com multicomutação empregado na determinação de 3-hidroxiacetato.....	40
FIGURA 2.2 - Diagrama de fluxos do módulo de análises empregado para a determinação de 3-hidroxiacetato em soro sanguíneo.....	41
FIGURA 2.3 - Influência da concentração do reagente NAD^+	47
FIGURA 2.4 - Influência da concentração hidrogeniônica sobre a reação enzimática.....	48
FIGURA 2.5 - Influência de variações na temperatura sobre a reação enzimática.....	49
FIGURA 2.6 - Registro de rotina referente à determinação de 3-hidroxiacetato em soro sanguíneo animal.....	50
FIGURA 2.7 - Curva analítica obtida para 3-hidroxiacetato.....	51
FIGURA 3.1 - Fórmula estrutural da molécula de glicose.....	57
FIGURA 3.2 - Mecanismo de reação para a determinação de glicose em amostras de soro animal.....	62
FIGURA 3.3 - Cella para detecção quimiluminescente.....	63
FIGURA 3.4 - Diagrama de fluxos do módulo de análise para a determinação de glicose.....	67
FIGURA 3.5 - Influência da vazão de bombeamento da solução transportadora (C) e das soluções dos reagentes luminol (R_1) e hexacianoferrato (III) (R_2) sobre a magnitude do sinal analítico.....	75
FIGURA 3.6 - Influência da concentração do luminol sobre o sinal analítico.....	76

FIGURA 3.7 - Influência da concentração do hexacianoferrato (III) sobre o sinal analítico.....	77
FIGURA 3.8 - Influência da concentração hidrogeniônica sobre a reação enzimática.....	78
FIGURA 3.9 - Influência da temperatura sobre a reação enzimática.....	79
FIGURA 3.10 - Registro dos sinais transientes referentes à determinação de glicose em soro de sangue animal.....	80
FIGURA 4.1 - Fórmula estrutural da molécula de colesterol.....	86
FIGURA 4.2 - Mecanismo de reação para a determinação do colesterol total em amostras de soro sanguíneo.....	90
FIGURA 4.3 - Diagrama de fluxos do módulo de análise para a determinação de colesterol total.....	95
FIGURA 4.4 - Avaliação de tempo de acionamento de válvula V_2 para inserção do volume da solução de amostra.....	102
FIGURA 4.5 - Influência da concentração do luminol sobre a intensidade quimiluminescente.....	104
FIGURA 4.6 - Influência da concentração do hexacianoferrato (III) sobre a intensidade quimiluminescente.....	105
FIGURA 4.7 - Influência da concentração hidrogeniônica sobre as reações enzimáticas.....	106
FIGURA 4.8 - Influência da temperatura sobre as reações enzimáticas.....	107
FIGURA 4.9 - Registro dos sinais transientes referente à determinação de colesterol com soluções de referências entre 25 e 125 mg L ⁻¹ de colesterol.....	109
FIGURA 4.10 - Curva analítica de colesterol.....	110
FIGURA 5.1 - Módulo de análise para a determinação simultânea de 3-hidroxibutirato, glicose e colesterol.....	115

Resumo

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS AUTOMÁTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE 3-HIDROXIBUTIRATO, GLICOSE E COLESTEROL EM SORO DE SANGUE ANIMAL EMPREGANDO MULTICOMUTAÇÃO EM FLUXO

No presente trabalho projetaram-se sistemas de injeção em fluxo visando a determinação de importantes parâmetros metabólicos, como 3-hidroxiacetil-CoA, glicose e colesterol, em soro de sangue animal. Os módulos de análise foram desenvolvidos baseando-se no conceito de multicomutação, cujas características principais favorecem o processamento de elevado número de amostra. Para isso, utilizaram-se válvulas solenóides de três vias, dispositivos de comutação discreta, para a adição intermitente de amostras e reagentes, controladas por um microcomputador equipado com uma interface eletrônica comercial (PCL-711S). Os programas para controle e aquisição de dados foram escritos em linguagem Quick BASIC 4.5. Os métodos propostos basearam-se em reações enzimáticas. Para isso, as enzimas foram imobilizadas em esferas de vidro e acondicionadas em mini-colunas de acrílico (15 x 5 mm d.i.). A determinação de 3-hidroxiacetil-CoA baseou-se na redução de dinucleotídeo adenina nicotinamida (NAD^+), formando o produto NADH, que foi monitorado em 340 nm. A curva analítica do sistema proposto apresentou faixa linear de concentração entre 25 e 150 mg L^{-1} , frequência analítica de 60 determinações por hora, desvio padrão relativo de 1,4% ($n=17$), estimado para uma amostra contendo 75 mg L^{-1} de 3-hidroxiacetil-CoA, e limite de detecção de 2 mg L^{-1} . Outros aspectos favoráveis observados foram baixo consumo de reagente NAD^+ (0,9 mg) e 3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase (8 μg), e 200 μL de amostra por determinação. Outro módulo de análises foi desenvolvido para a determinação de glicose por detecção quimiluminescente. A glicose foi oxidada pela glicose oxidase a ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reagia com o luminol, na presença do catalisador hexacianoferrato (III), produzindo uma luminescência azul com comprimento de onda em torno de 420 nm. A curva analítica do sistema proposto apresentou faixa linear de concentração entre 50 e 600 mg L^{-1} , desvio padrão relativo $< 3,0\%$ ($n=20$) para amostra contendo 300 mg L^{-1} de glicose, limite de detecção de 14,0 mg L^{-1} , e

freqüência analítica de 60 determinações por hora. O consumo de amostra, hexacianoferrato (III) e luminol foram de 46 μL , 10,0 mg e 0,2 mg por determinação, respectivamente. Para finalizar este trabalho, foi proposta a determinação de colesterol. Os ésteres de colesterol foram hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre foi oxidado pela colesterol oxidase a colesteno e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio reagia com luminol e hexacianoferrato (III), sendo detectado por quimiluminescência. O sistema proposto apresentou freqüência analítica de 40 determinações por hora, desvio padrão relativo de 2,3% ($n=20$) para amostra contendo 75 mg L^{-1} de colesterol, linearidade na faixa de concentração entre 25 e 125 mg L^{-1} e limite de detecção estimado em 3,7 mg L^{-1} . O consumo de reagentes foi de 0,22 mg de luminol e 2,75 mg de hexacianoferrato (III) por determinação. Uma vez definidas as melhores condições de análise, um conjunto de amostras foi analisado empregando os três sistemas propostos. Aplicando-se o teste t entre os resultados obtidos com os sistemas propostos e aqueles obtidos com os procedimentos manuais de análises (*kit*), não foi observada diferença significativa em nível de 95% de confiança.

Abstract

DEVELOPMENT OF AUTOMATIC PROCEDURES FOR THE DETERMINATION OF 3-HYDROXYBUTYRATE, GLUCOSE AND CHOLESTEROL IN ANIMAL BLOOD SERUM USING IN FLOW MULTICOMMUTATION

In the present work, in flow injection systems were developed for the determination of important metabolic parameters, such as 3-hydroxybutyrate, glucose and cholesterol in animal blood serum. The analysis modules were developed based on the multicommutation concept, whose main characteristics favor the processing of many samples. For this, three-way solenoid valves were used, as discreet commutation devices, for the intermittent addition of samples and reagents, controlled by a microcomputer equipped with a commercial electronic interface (PCL-711S). The control and data acquisition programs were written in Quick BASIC 4.5. The proposed methods are based on enzymatic reactions. For these, the enzymes were immobilized in glass beads and packed in mini-columns of acrylic (15 x 5 mm i.d.). The determination of 3-hydroxybutyrate was based on the reduction of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), forming NADH, which was monitored at 340 nm. The analytical curve of the proposed system presented a linear dependence on concentration for concentrations between 25 and 150 mg L^{-1} , an analytical frequency of 60 determinations per hour, relative standard deviation of 1.4% ($n=17$), estimated for a sample containing 75 mg L^{-1} of 3-hydroxybutyrate, and a detection limit of 2 mg L^{-1} . Other observed favorable aspects were low reagent consumption of NAD^+ (0.9 mg) and 3-hydroxybutyrate dehydrogenase (8 μg), and 200 μL of sample per determination. Another analysis module was developed for glucose determination using chemiluminescence detection. The glucose was oxidized by glucose oxidase to gluconic acid and hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide formed reacted with the luminol, in the presence of the catalyst hexacyanoferrate (III), producing a blue luminescence at a wavelength around 420 nm. The analytical curve of the proposed system was linear for concentrations between 50 and 600 mg L^{-1} , showed a relative standard deviation $<3.0\%$ ($n=20$) for a sample containing 300 mg L^{-1} of glucose, a detection limit of 14.0 mg L^{-1} , and an analytical frequency of 60 determinations per hour. The sample, hexacyanoferrate (III) and luminol consumption was 46 μL ,

10.0 mg and 0.2 mg per determination, respectively. To conclude this work, the determination of cholesterol was proposed. The esters of cholesterol were hydrolyzed by cholesterol esterase to free cholesterol and fatty acid. The free cholesterol was oxidized by cholesterol oxidase to cholestenone and hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide reacted with luminol and hexacyanoferrate (III), being detected by chemiluminescence. The proposed system presented an analytic frequency of 40 determinations per hour, relative standard deviation of 2.3% (n=20) for a sample containing 75 mg L⁻¹ of cholesterol, a linear dependence in the concentration range of 25 and 125 mg L⁻¹, and an estimated detection limit of 3.7 mg L⁻¹. The reagent consumption was 0.22 mg of luminol and 2.75 mg of hexacyanoferrate (III) per determination. Once the best analysis conditions were found, a set of samples was analyzed using the three proposed systems. Applying the *t* test among the results obtained with the proposed systems and those obtained with the manual procedures of analysis (kit), no significant difference was observed at the 95% confidence level.

Sumário

1 - INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 - Sangue e nutrição animal.....	1
1.2 - Sistemas de análises em fluxo e multicomutação.....	6
1.3 - Quimiluminescência - Princípios e Aplicações.....	11
1.3.1 - Princípios.....	11
1.3.2 - Aplicações.....	15
1.4 - Enzimas, métodos de imobilização e suas aplicações analíticas.....	18
1.4.1 - Enzimas.....	18
1.4.2 - Métodos de imobilização.....	24
1.4.2.1 - Ligação química covalente.....	24
1.4.2.1.1 - Imobilização em sílica de porosidade controlada.....	24
1.4.2.2 - Ligação química covalente cruzada.....	25
1.4.2.3 - Oclusão em gel.....	26
1.4.2.4 - Adsorção física.....	26
1.4.2.5 - Microencapsulação.....	26
1.4.2.6 - Polimerização eletroquímica.....	26
1.4.3 - Aplicações analíticas.....	27
1.5 – Objetivos.....	29
2 - SISTEMA DE ANÁLISES EM FLUXO EMPREGANDO MULTICOMUTAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE 3-HIDROXIBUTIRATO EM SORO DE SANGUE ANIMAL.....	30
2.1 - Introdução.....	30
2.2 - Revisão de literatura.....	31
2.2.1 - Aspectos gerais.....	31

2.2.2 - Significado clínico da concentração de 3-hidroxiacetato em soro de sangue animal.....	32
2.2.3 - Métodos analíticos para a determinação de 3-hidroxiacetato.....	33
2.3 - Parte experimental.....	35
2.3.1 - Princípio do método.....	35
2.3.2 - Materiais.....	35
2.3.2.1 - Equipamentos e acessórios.....	35
2.3.2.2 - Reagentes e soluções.....	36
2.3.3 - Imobilização enzimática.....	37
2.3.4 - Recomendações e procedimento para coleta de amostras de sangue animal.....	37
2.3.5 - Procedimento em fluxo.....	39
2.3.5.1 - Descrição geral do sistema.....	39
2.3.5.2 - Descrição do módulo de análise para a determinação de 3-hidroxiacetato.....	40
2.3.5.3 - Influência do volume da solução da amostra.....	42
2.3.5.4 - Influência da vazão de bombeamento das soluções.....	42
2.3.5.5 - Influência do comprimento do reator tubular helicoidal.....	42
2.3.5.6 - Influência da concentração do reagente NAD ⁺	43
2.3.5.7 - Influência da concentração hidrogeniônica	43
2.3.5.8 - Influência da temperatura	43
2.3.5.9 - Determinação de 3-hidroxiacetato em amostras de soro sanguíneo.....	43
2.3.5.10 - Avaliação da estabilidade da coluna enzimática.....	44
2.3.6 - Procedimento manual.....	44
2.4 - Resultados e discussão.....	45
2.5 - Conclusões.....	54

3 - SISTEMA DE ANÁLISES EM FLUXO EMPREGANDO MULTICOMUTAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE GLICOSE EM SORO DE SANGUE ANIMAL USANDO REAÇÃO ENZIMÁTICA E DETECÇÃO QUIMILUMINESCENTE.....	55
3.1 - Introdução.....	55
3.2 - Revisão de literatura.....	56
3.2.1 - Aspectos gerais.....	56
3.2.2 - Significado clínico da concentração de glicose em soro animal.....	57
3.2.3 - Métodos analíticos para a determinação de glicose.....	58
3.3 - Parte experimental.....	62
3.3.1 - Princípio do método.....	62
3.3.2 - Materiais.....	63
3.3.2.1 - Equipamentos e acessórios.....	63
3.3.2.2 - Reagentes e soluções.....	64
3.3.3 - Imobilização enzimática.....	65
3.3.4 - Descrição do procedimento em fluxo.....	66
3.3.4.1 - Estudo do intervalo de tempo para acionamento de válvulas.....	68
3.3.4.2 - Influência da vazão de bombeamento das soluções.....	69
3.3.4.3 - Influência do comprimento do reator tubular helicoidal.....	69
3.3.4.4 - Influência das concentrações dos reagentes.....	69
3.3.4.5 - Influência da concentração hidrogeniônica	69
3.3.4.6 - Influência da temperatura.....	70
3.3.4.7 - Determinação de glicose em amostras de soro sanguíneo animal.....	70
3.3.4.8 - Avaliação da estabilidade da coluna enzimática.....	70
3.3.5 - Procedimento manual.....	70
3.3.6 - Amostras.....	72
3.4 - Resultados e discussão.....	72

3.5 - Conclusões.....	83
4 - SISTEMA DE FLUXO EMPREGANDO MULTICOMUTAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL EM AMOSTRAS DE SANGUE ANIMAL POR QUIMILUMINESCÊNCIA.....	84
4.1 - Introdução.....	84
4.2 - Revisão de literatura.....	85
4.2.1 - Aspectos gerais.....	85
4.2.2 - Significado clínico da concentração de colesterol em soro animal.....	86
4.2.3 - Métodos analíticos para a determinação de colesterol.....	87
4.3 - Parte experimental.....	90
4.3.1 - Princípio do método.....	90
4.3.2 - Materiais.....	91
4.3.2.1 - Equipamentos e acessórios.....	91
4.3.2.2 - Reagentes e soluções.....	92
4.3.3 - Imobilização enzimática.....	93
4.3.4 - Descrição do procedimento em fluxo.....	94
4.3.4.1 - Influência da vazão de bombeamento das soluções.....	96
4.3.4.2 - Influência do comprimento do reator tubular helicoidal.....	97
4.3.4.3 - Influência do volume da solução da amostra.....	97
4.3.4.4 - Influência das concentrações dos reagentes luminol e hexacianoferrato (III).....	97
4.3.4.5 - Influência da concentração hidrogeniônica.....	97
4.3.4.6 - Influência da temperatura.....	98
4.3.4.7 - Influência dos potenciais interferentes na determinação do colesterol total.....	98
4.3.4.8 - Determinação de colesterol total em amostras de soro animal.....	98
4.3.4.9 - Avaliação da estabilidade do sistema.....	98
4.3.5 - Procedimento manual.....	99

4.3.6 - Amostras.....	100
4.4 - Resultados e discussão.....	101
4.5 - Conclusões.....	112
5 - CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	114
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 - Sangue e nutrição animal

Dentre os fluidos que circulam pelo organismo animal, o sangue é o que compreende o maior número de funções importantes, BAUM (1978): transporte de oxigênio do lugar de apreensão para todas as partes do corpo, transporte de nutrientes do trato gastrointestinal para as várias partes do corpo onde serão usados ou armazenados, transporte de produtos de excreção das células ou órgãos onde são formados para os órgãos de excreção (rins), transporte de produtos metabólicos que se formam numa parte do corpo para outras, onde serão utilizados, e também o transporte de calor das partes mais internas do corpo para a superfície, onde o mesmo pode ser dissipado. O sangue serve também de sistema de comunicação dentro do corpo, pelo transporte de substâncias que regulam a função de certos órgãos. Um exemplo é o hormônio secretina, que controla a secreção do pâncreas. O sangue funciona em certos tipos de movimento, como por exemplo, no rastejamento da minhoca. A porção anterior do corpo distende-se pela pressão do sangue, sendo a força necessária para isso transmitida pela contração dos músculos circulares da parede do corpo, SCHMIDT-NIELSEN (1972).

O sangue pode ser dividido basicamente em duas partes: o plasma, um fluido viscoso complexo que contém o soro e o fibrinogênio, e os elementos formadores que são as células do sangue, que contém os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas. O plasma é uma solução complexa, com aproximadamente 90 e 92% de água e entre 8 e 10% de sólidos dissolvidos. Contém todos os compostos bioquimicamente relevantes tais como carboidratos, aminoácidos, proteínas, lipoproteínas, enzimas, hormônios, vitaminas e íons inorgânicos. As células são separadas do plasma por centrifugação do sangue. Se o sangue é coagulado, o fibrinogênio é removido da célula, e o fluido remanescente é chamado de soro. A distinção entre o plasma e o soro é a presença de fibrinogênio no plasma. A maioria das análises clínicas é feita no sangue, plasma ou soro, CHRISTIAN (1986).

Uma amostra de sangue permanece líquida por alguns minutos e, após um pequeno intervalo de tempo, apresenta um aspecto gelatinoso. Esse processo é

chamado de coagulação. Nesse caso, no exame de uma amostra de sangue empregando lâmina ao microscópico, notam-se delicadas estruturas filiformes que formam uma rede. Essa rede, que forma o coágulo, é constituída da proteína fibrina (o nome é derivado da estrutura fibrosa do coágulo), a qual se forma a partir de outra proteína, o fibrinogênio, presente numa proporção de 0,3% no sangue. A reação de conversão de fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel é catalisada por uma enzima, a trombina. Essa enzima está ausente no sangue circulante, a razão pela qual o sangue não coagula nos vasos, SCHMIDT-NIELSEN (1972).

De cada animal deve ser coletada quantidade de sangue suficiente para se obter volume de soro ou plasma para as determinações desejadas. Após a separação do soro ou plasma, as amostras devem ter coloração amarelada. Coloração avermelhada indica que houve hemólise, que é a destruição de células vermelhas, com a liberação da hemoglobina e outras células constituintes do fluido (soro ou plasma), o que inviabiliza a determinação de espécies químicas, devendo então se descartar a amostra, CHRISTIAN (1986).

Amostras de soro ou plasma já desproteinizadas são mais estáveis e podem ser refrigeradas por até quatro semanas. No entanto, as amostras devem ser congeladas quando o período entre a coleta e a determinação for superior a esse período, NOGUEIRA et al. (1998).

Nas regiões tropicais e subtropicais, em sistemas de manejo de baixo investimento, as dietas de ruminantes são freqüentemente deficientes em nutrientes, especialmente no período seco, tornando necessária a suplementação alimentar.

As deficiências nutricionais podem refletir, de modo indireto, na composição química do sangue, especialmente nas concentrações plasmáticas de glicose e proteínas totais. Segundo EKMAN (1976), a variação na alimentação afeta vários constituintes sanguíneos, sendo que existem evidências de uma clara relação entre consumo de energia e nível de glicose no sangue.

A interferência do homem é de fundamental importância para melhorar a produção do gado bovino, especialmente na alimentação, pois em condições naturais, o gado sofre com a escassez de alimento no período seco. O criador pode melhorar essa situação produzindo os alimentos na fazenda, obtendo, com economia, maior produtividade do rebanho. Não basta que uma vaca tenha carga genética para ser uma grande produtora de leite, é necessário que sua aptidão

leiteira seja apoiada com uma boa alimentação e manejo adequado. Assim, o animal estará capacitado a dar o máximo de rendimento produtivo, MARQUES et al. (1981).

Para monitorar o estado nutricional dos animais, PAYNE e PAYNE (1987) sugerem a elaboração de um perfil metabólico, o qual consiste na determinação dos teores de alguns constituintes bioquímicos encontrados no sangue animal. De acordo com EKMAN (1976), através do perfil metabólico é possível associar as possíveis relações entre alimentação, constituintes sanguíneos e desempenho animal.

Os fatores inerentes ao ambiente e manejo, incluindo “stress térmico”, desbalanços nutricionais, tais como carências ou excesso de energia, proteína ou minerais e vitaminas, podem comprometer a taxa de prenhez do rebanho, FERGUSON e CHALUPA (1989), SON et al. (1996).

Um dos principais objetivos do manejo de vacas, durante o período pré-parto, é minimizar o processo de mobilização de gordura corpórea e, assim, reduzir os efeitos negativos que esse processo possa causar sobre o desempenho da vaca leiteira, GRUMMER (1995). E ainda, segundo DRACKLEY (1998a), o correto manejo da vaca leiteira durante o período pré-parto é fundamental para a eficiência econômica de uma propriedade leiteira, uma vez que problemas durante esta fase podem resultar em aumento nos custos de veterinário e medicamentos. Associado a isto, durante o início de lactação, problemas metabólicos podem diminuir o desempenho reprodutivo e provocar perdas na produção de leite. Os cuidados na alimentação de vacas durante esta fase são de extrema importância, pois têm implicações sobre o desempenho produtivo, sobre a incidência de distúrbios metabólicos, desempenho reprodutivo, eficiência do sistema imunológico e saúde geral do animal, DRACKLEY (1998a), DRACKLEY (1998b), MALLARD et al. (1998.), GOFF e HORST (1997), BELL (1995). Essas implicações, por fim, têm impacto direto ou indireto na rentabilidade econômica de um sistema de produção de leite, DRACKLEY (1998a).

A avaliação dos alimentos usados na nutrição animal é um assunto de grande importância, pois para uma alimentação eficiente de bovinos e outros animais é necessário conhecer suas exigências, assim como a extensão pela quais diferentes alimentos suprem as necessidades, SILVA e LEÃO (1979).

Uma ração balanceada é aquela que contém, em proporções corretas, todos os nutrientes de que o animal necessita para manutenção e bom rendimento.

O balanceamento da ração “não é somente questão de quantidade, nem sequer de qualidade, mas de ambos os fatores, combinados com o fator econômico”, MARQUES et al. (1981).

Na criação e exploração do gado, a alimentação é importante pela influência que exerce sobre a produção, melhoramento, saúde e rendimento econômico dos animais, com reflexos no ganho de peso, secreção do leite, trabalho muscular e acumulação de gordura.

Por outro lado, as características e aptidões de cada indivíduo são também influenciadas pela sua constituição genética. Todavia, a plena exteriorização da potencialidade genética só é possível quando a alimentação é adequada e suficiente, de acordo com as exigências individuais. Em caso contrário, a má alimentação funciona como fator limitante da produção e, embora o indivíduo possua geneticamente aptidão para produzir, fica impossibilitado de revelá-la integralmente.

São bem conhecidos casos de animais de raça pura, dotados de boa capacidade genética que, quando criados em condições desfavoráveis, sobretudo em regime de subnutrição, perdem características de conformação e outros atributos, isto é, “degeneram”, como dizem os criadores. Assim sendo, só a alimentação correta, suficiente e adequada, permite a plena manifestação da capacidade produtiva do animal, condicionada potencialmente pela sua constituição genética.

Quando a alimentação é insuficiente em quantidade ou desequilibrada, com insuficiência de determinados nutrientes, o estado de saúde é prejudicado e surgem perturbações diversas. Tais perturbações, de acordo com as carências que podem ocorrer, são diminuição da eficiência reprodutiva, retardamento ou paralisação do crescimento, queda da produção de leite, falta de vivacidade, pelagem arrepiada e sem brilho, perda de peso e anormalidades diversas. A diminuição da resistência orgânica, causada pelo baixo nível de nutrição ou por carências específicas, favorece a manifestação de doenças infecciosas. Por outro lado, a boa alimentação, suficiente e equilibrada, constitui o meio mais prático para a prevenção de doenças.

Segundo especialistas, a prática comum de fornecer aos animais rações com quantidades insuficientes de uma ou mais substâncias indispensáveis

representa, provavelmente, o principal fator limitante das produções de carne e leite, JARDIM (1976).

Nos últimos anos, a nutrição animal evoluiu consideravelmente devido ao constante progresso das ciências que formam a sua base, e aos novos conhecimentos resultantes de trabalhos de pesquisa, continuamente realizados em laboratórios de diversas partes do mundo.

A utilização dos conhecimentos acumulados pela ciência da nutrição na prática da alimentação é uma tarefa árdua, principalmente, quando o objetivo é esclarecer o criador, com um mínimo de terminologia científica, sobre noções básicas e práticas de escolha, preparação, mistura e de distribuição dos alimentos em quantidades e proporções adequadas, sem perder o aspecto econômico e as exigências das várias categorias de animais, considerando ainda a natureza e o nível de suas produções.

Todavia, é necessário sempre que os novos conhecimentos sejam divulgados, pelo menos em parte, a fim de que a distância entre os técnicos e os criadores não aumente e a economia da produção seja beneficiada pela mais ampla aplicação dos resultados de pesquisas, que não devem permanecer apenas registrados em publicações especializadas.

Originalmente, produtores, técnicos e pesquisadores mantiveram seu foco principal no manejo e nutrição de vacas lactantes, visto serem, aparentemente, as principais responsáveis pelo retorno financeiro de uma propriedade leiteira, GRUMMER (1995).

A análise de parâmetros metabólicos em fluidos biológicos permite, aos pesquisadores da área de Ciências animais, um maior conhecimento sobre a eficiência de absorção dos nutrientes ministrados. Esse conhecimento tem originado a adoção de novos hábitos alimentares, prevenindo desequilíbrios causados por superdosagens ou deficiências nutritivas, CHASSAGNE e BARNOUIN (1992), ABDALLA et al. (1996). Como consequência, o aumento na taxa de crescimento, menor tempo de engorda, aumento na produção de leite, animais mais resistentes, tem sido observado. Assim, realizando periodicamente a determinação de alguns parâmetros metabólicos, obtém-se um quadro clínico do animal e, juntamente com as informações coletadas ao longo do experimento, é obtido um quadro nutricional.

A seção de Ciências Animais do Centro de Energia Nuclear na Agricultura tem investigado os efeitos da nutrição no desenvolvimento geral de

ovinos e bovinos. Uma das dificuldades encontradas pelos pesquisadores para o controle dos parâmetros metabólicos, é a grande quantidade de determinações que precisam ser realizadas. Estas determinações são efetuadas manualmente com a utilização de métodos prontos, recomendados pela Agência Internacional de Energia Nuclear, sendo os reagentes adquiridos na forma de *Kit*, JOINT FAO/IAEA PROGRAMME (1993a).

Os métodos empregados baseiam-se em reações de complexação ou enzimáticas, e as detecções são realizadas por espectrofotometria de absorção molecular, JOINT FAO/IAEA PROGRAMME (1993a), envolvendo etapas analíticas lentas, trabalhosas e dispendiosas. Assim, há a necessidade de se utilizar procedimentos automatizados para diminuir o consumo de reagentes e o tempo para a obtenção de resultados. Métodos analíticos baseados no processo de análises por injeção em fluxo (FIA), são um dos processos automáticos que podem ser utilizados para essa finalidade. Esses apresentam, geralmente, baixo custo de aquisição dos equipamentos, rapidez na emissão dos resultados e podem ser facilmente adaptados a novos procedimentos analíticos. O emprego de tais métodos para a determinação de parâmetros metabólicos no soro sanguíneo pode ser uma poderosa ferramenta na aquisição de resultados aplicáveis à pesquisas na área de ciências animais.

1.2 - Sistemas de análises em fluxo e multicomutação

A crescente necessidade de automação de procedimentos analíticos se deve ao grande aumento do número de amostras laboratoriais a serem analisadas, principalmente nas áreas clínicas e ambientais, e à demanda por técnicas rápidas e confiáveis permitindo, assim, a aquisição de um maior número de informações utilizando menor tempo e esforço humano, VALCÁRCEL (1992).

Os procedimentos baseados no conceito de análise por injeção em fluxo (FIA) apresentam alta frequência analítica, facilidade operacional, boa precisão e exatidão, redução de custos devido ao baixo consumo de reagentes e amostras e uma segurança maior para o operador no manuseio das soluções, CROOK (1993), BRUNNER (1992).

O primeiro sistema de análise em fluxo foi proposto em 1957, por SKEGGS, no qual foi desenvolvido um sistema para análise contínua de uréia em

sangue. As principais características desta técnica foram a introdução da amostra por aspiração contínua com segmentação por ar e a permanência do analito no sistema até a obtenção do equilíbrio químico. Os estados de equilíbrio foram atingidos com longos tempos de residência da zona da amostra e a dispersão minimizada pela inserção de bolhas de ar.

A análise química por injeção em fluxo tem como conceito a introdução da solução da amostra em um fluido transportador, e esse transporta a amostra em direção à cela de detecção. Ao longo do percurso analítico pode receber reagentes e passar por etapas de processamentos, como extração líquido-líquido, pré-concentração, diluição em linha, etc, KRONKA e colaboradores (1997).

Em 1975, RUZICKA e HANSEN propuseram o conceito de FIA visando a automatização de procedimentos analíticos. Neste sistema, as condições de reação podem ser facilmente controladas e repetidas, ocorrendo em ambiente fechado, tendo como vantagem a diminuição dos riscos de contaminação. A grande aceitação desse processo de análise química se deve à simplicidade da instrumentação e à versatilidade do módulo de análise, possibilitando a implementação de procedimentos analíticos automáticos, utilizando instrumentos de baixo custo.

O interesse pelo desenvolvimento de módulos de análise para a determinação de mais uma espécie química foi publicado por STEWART e RUZICKA, em 1976, no qual foi proposto um módulo de análise para a determinação paralela de amônio e fosfato. Para isso, foram empregadas duas celas de fluxo, alinhadas no caminho óptico do mesmo espectrofotômetro. Como os tempos de residência eram distintos, foi possível a medida seqüencial dos dois sinais analíticos. Desde então, observou-se um crescente interesse pelo desenvolvimento de sistemas para a determinação de mais de uma espécie em uma mesma matriz, LUQUE DE CASTRO e VALCÁRCEL (1984), LUQUE DE CASTRO (1986), CAMPANELLA et al. (1996). As principais vantagens de sistemas visando determinações simultâneas e seqüenciais são maior freqüência analítica, menor manipulação da amostra e menor tempo de dedicação por parte do analista.

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) define automação 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*), KINGSTON e KINGSTON (1994). 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, GUILBAULT e HJELN (1989).

Nos primeiros sistemas propostos, a solução da amostra era injetada no percurso analítico através de uma seringa hipodérmica que perfurava com a agulha um septo de borracha, colocado em um dispositivo que foi chamado de injetor, RUZICKA e HANSEN (1975). Empregando esse dispositivo, a repetibilidade dos resultados era afetada pela precisão do volume das alíquotas de amostra pela seringa e por alterações na vazão. Assim, os resultados eram dependentes da experiência do operador. Além disso, esse dispositivo tinha uma vida útil curta, visto que após duas ou três dezenas de injeções, o septo de borracha começava a apresentar vazamentos, REIS e BERGAMIN (1993).

Com o avanço da tecnologia, outros dispositivos foram propostos tais como o injetor proporcional e as válvulas rotativas de 6 e 8 vias, que são empregados em maior escala. As válvulas solenóides de três vias também têm sido empregadas, oferecendo, como vantagem, o acionamento individual e seqüencial. Uma revisão sobre os diferentes injetores utilizados em sistemas FIA foi apresentada por REIS e BERGAMIN (1993), enfatizando o emprego para a introdução da amostra e a possibilidade de implementar diferentes sistemas para o gerenciamento de soluções. KRUG et al. (1986) apresentaram a versatilidade do injetor proporcional, revisando os diferentes sistemas implementados com esse dispositivo.

Sistemas de análises em fluxo devem ser caracterizados pela indicação do tipo de fluxo (segmentado, não-segmentado ou monossegmentado) e pela forma como a alíquota da amostra é introduzida (contínua ou discreta/intermitente). Para os métodos em fluxo segmentado, esclarecimento adicional deve ser fornecido quando o segmentador não for o ar, ZAGATTO et al. (1999). A amostragem contínua pode ser segmentada ou não, enquanto a amostragem intermitente pode ser feita por aspiração, bombeamento ou injeção da amostra. O fluxo gerado através da aspiração contínua da amostra e reagente pode ser segmentado ou não, correspondente à técnica de análise em fluxo contínuo (CFA). A injeção da amostra em fluxo não-segmentado abrange o sistema FIA, enquanto a injeção da amostra em fluxo monossegmentado abrange os processos

de análise em fluxo monossegmentado (MSFA), onde a alíquota da amostra injetada é intercalada entre duas bolhas de ar.

A MSFA desenvolvida por PASQUINI e OLIVEIRA em 1985, associa algumas das vantagens dos sistemas FIA (frequência de amostragem, reprodutibilidade e simplicidade) com alguns dos sistemas CFA (baixa dispersão e aplicação a métodos que envolvem reações com cinética lenta). Os autores, nesse trabalho, não permitiram a passagem de bolhas pela cela de detecção, utilizando um separador gás-líquido, colocado antes do detector.

RUZICKA e MARSHALL (1990) propuseram um novo processo de análise em fluxo, denominado análise por injeção seqüencial (SIA). Os sistemas SIA empregam válvulas seletoras de 6 ou 8 vias como dispositivos para inserção das soluções, controladas por um microcomputador. Cada medida é iniciada pela aspiração da solução de lavagem, seguida da injeção da amostra e reagentes, após o movimento de reversão do fluxo, realizado pela bomba peristáltica ou bomba de pistão. Assim, as alíquotas são injetadas seqüencialmente em um reator, passando pela cela de fluxo e seguindo para o descarte. A dispersão mútua das alíquotas injetadas é alcançada através do movimento pré-selecionado por *software* dessas zonas em direção ao detector. O ciclo para cada leitura é finalizado somente no momento em que o fluxo for revertido. Simultaneamente, as zonas dispersas retornam para o sistema e são dirigidas para o descarte, MARTELLI (1997).

REIS et al. (1994) propuseram uma nova técnica para a introdução de amostras e reagentes denominada amostragem binária. Esse processo consiste em inserir, alternadamente, pequenas alíquotas de amostra e reagentes no percurso analítico, utilizando válvulas solenóides controladas por microcomputador. Durante o transporte da zona de amostra em direção à cela de detecção, ocorre a dispersão mútua nas diversas interfaces líquidas originadas entre as alíquotas das soluções. A inserção seqüencial de pequenas alíquotas permite melhorar a mistura entre amostra e reagentes, devido à maior interpenetração das interfaces amostra/reagente. A inserção das soluções da amostra e dos reagentes no percurso analítico pode ser manipulada empregando-se apenas um canal de aspiração. O processo é repetido até a introdução da seqüência de alíquotas definidas pelo operador, sendo o número de conjuntos contendo amostra e reagentes denominado número de ciclos de amostragem. O emprego de dispositivos discretos acionados

(comutados) em diferentes estágios para a introdução das soluções, originou o termo multicomutação.

O processo de multicomutação apresenta uma grande versatilidade, permitindo sua exploração em diferentes procedimentos analíticos. Os módulos de análise propostos são simples e versáteis, devido ao controle independente dos dispositivos e à possibilidade de se efetuar a aquisição dos dados gerados.

No primeiro artigo da série sobre multicomutação, REIS e colaboradores (1994) descreveram os conceitos envolvidos e a instrumentação necessária para implementar o processo da amostragem binária, que foi aplicado à determinação de ferro em plantas. Foram destacadas algumas potencialidades do sistema, como a versatilidade, a possibilidade de manipular pequenos volumes e a redução no consumo de amostra e reagentes e, conseqüentemente, a baixa geração de efluentes. A influência de parâmetros, tais como o volume da cela de fluxo, comprimento do percurso analítico e pulsação da bomba peristáltica sobre a qualidade dos resultados foi discutida nesse trabalho.

No segundo artigo da série sobre multicomutação, MARTELLI et al. (1995) demonstraram a viabilidade do sistema para determinação espectrofotométrica de níquel, ferro e crômio em ligas metálicas, empregando dimetilglioxima, ácido salicílico e difenilcarbazida, respectivamente. Nesse trabalho, foram exploradas a adição intermitente de diferentes reagentes e a alteração das condições reacionais, ampliando as possibilidades de efetuar determinações seqüenciais em sistemas de análises em fluxo, sem a necessidade de alterar sua configuração.

O processo de multicomutação foi utilizado para implementar a determinação simultânea de cobre e zinco em plantas. OLIVEIRA et al. (1996) exploraram a discriminação cinética, utilizando zincon como reagente cromogênico. Uma válvula solenóide de três vias permitiu a divisão da zona de amostra em duas partes que atravessaram percursos analíticos distintos antes de alcançar a cela de fluxo. Devido aos diferentes tempos de residência, dois sinais analíticos foram gerados. O primeiro foi proporcional à concentração de zinco e o segundo sinal permitiu a determinação conjunta dos dois íons metálicos. A concentração do cobre foi obtida pela diferença entre os dois sinais.

Um outro módulo de análise foi desenvolvido para determinação seqüencial de amônio e ortofosfato em digeridos de materiais vegetais, com apenas

um canal para aspiração das soluções, KRONKA et al. (1996). As reações empregadas requereram a adição de dois reagentes para cada uma das espécies: para a determinação de amônio, ácido salicílico e hipoclorito de sódio e, para a determinação de ortofosfato, molibdato de amônio e ácido ascórbico. Além disso, a reação envolvida na determinação de amônio ocorria em meio básico, enquanto a determinação de ortofosfato era efetuada em meio ácido. Devido à velocidade relativamente lenta das reações envolvidas, o tempo de residência da zona de amostra foi aumentado, reduzindo-se a rotação da bomba peristáltica após a inserção das soluções no percurso analítico. Esse artifício foi implementado por meio de uma interface eletrônica disponível na bomba peristáltica, com o auxílio de um *software* desenvolvido.

Os processos de multicomutação e amostragem binária também foram explorados por ARAÚJO et al. (1995), que implementaram a determinação espectrofotométrica de creatinina em urina, utilizando a reação com ácido pícrico. O diagrama de fluxo foi projetado para permitir a parada de fluxo visando aumentar a taxa de conversão do analito, devido à velocidade da reação ser relativamente lenta. O processo de reamostragem na zona dispersa foi utilizado para adequar a concentração de creatinina nas amostras e a faixa de resposta do equipamento. Para aumentar a taxa de conversão do analito, uma fração da amostra foi retida em um reator aquecido a 37 °C.

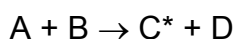
Recentemente, ROCHA et al. (2002) publicaram uma revisão de multicomutação em análises em fluxo descrevendo conceitos, aplicações e tendências, enfatizando a implementação de sistemas em fluxo *tandem*, controle de diluições, determinações seqüenciais, titulações, separação e pré-concentração em linha.

1.3- Quimiluminescência - Princípios e Aplicações

1.3.1 - Princípios

O uso analítico da quimiluminescência (QL) está sendo cada vez mais difundindo como uma alternativa simples, barata e sensível para quantificar uma grande variedade de compostos.

A QL é um fenômeno que envolve a emissão de luz, geralmente, na região do visível ou infravermelho, produzida por uma reação química. Essas reações geram produtos eletronicamente excitados, que emitem luz quando retornam ao estado fundamental, CALATAYUD (1996). Reações similares ocorrem na natureza (produzida por organismos vivos) onde é chamada especificamente de bioluminescência, KRICKA (1993). O processo da QL pode ser esquematizado na seguinte reação:



onde (*) indica o estado excitado.

Para a reação química ser apropriada à detecção quimiluminescente, três fatores essenciais precisam estar associados: a reação precisa ser exotérmica, pois uma quantidade adequada de energia deve ser gerada para a formação do estado eletrônico excitado (para emissão na região do visível, o mínimo de energia requerida é de 180 kJ mol^{-1}), deve existir um caminho de reação para a formação do estado eletrônico excitado, a molécula no estado excitado deve ser capaz de perder energia como um fóton, ou ser capaz de transferir esta energia para uma outra molécula, ROBARDS e WORSFOLD (1992).

Quando há emissão de luz por uma substância previamente excitada por uma radiação eletromagnética temos o fenômeno da fluorescência ou da fosforescência. Na fluorescência, o estado excitado é um singlete e a transição para o estado fundamental é muito rápida, na ordem de 10^{-5} a 10^{-8} s. Na fosforescência, o estado excitado é um tripleto e a transição para o estado fundamental é mais moderada, os átomos ficam excitados por um tempo superior a fluorescência. Se uma molécula ou o seu produto de oxidação for fluorescente, então existe a possibilidade de sua oxidação gerar QL. Entretanto, há exceções para esse princípio e, em muitos casos, a reação quimiluminescente não pode ser prevista, ROBARDS e WORSFOLD (1992).

A QL em Química Analítica tem inúmeras vantagens que incluem alta sensibilidade, uma ampla faixa de resposta linear em função da concentração, e instrumentação simples, DODEIGNE et al. (2000). A sensibilidade, em geral, é alta devido à ausência de fonte de radiação externa, reduzindo ou eliminando assim, problemas como luz difusa, espalhamento de luz e ruídos provenientes da fonte. E,

como não necessita de discriminação de comprimentos de onda, a instrumentação necessária para sua implementação é relativamente simples, quando comparada com outros métodos ópticos. Mas, há algumas desvantagens, tais como baixa reprodutibilidade e alto tempo de observação, embora a maioria das reações não sejam lentas quando comparadas a outros métodos de detecção, NAVAS e JIMÉNEZ (1996).

O fenômeno de QL é conhecido desde 300 anos a.C., mas o desenvolvimento das aplicações analíticas é relativamente recente. Devido ao baixo limite de detecção, ampla faixa analítica, e a sua alta sensibilidade e seletividade, os métodos baseados em detecções quimiluminescentes têm se tornado uma ferramenta analítica de grande utilidade. A primeira aplicação da QL como técnica analítica foi desenvolvida por Erdey em 1957, o qual estudou o uso de várias substâncias como luminol, lofina e luciferina como indicadores volumétricos. As investigações sobre o potencial analítico da QL para análises de rotina são datadas dos anos 70 para reações em fase gasosa e, na década de 80, para reações em fase líquida. Desde então, os métodos quimiluminescentes têm sido largamente utilizados, fundamentalmente, em análises bioquímicas e ambientais, e o número de publicações e comunicações sobre o tema tem sido incrementado de forma exponencial desde a primeira proposta, como citado no Simpósio Internacional de Bioluminescência e Quimiluminescência, realizado em Bruxelas em 1978, GARCÍA-CAMPAÑA et al. (2001).

A lofina ou 2,4,5-trifenilimidazol (Figura 1.1) foi o primeiro composto orgânico a apresentar uma reação quimiluminescente, preparada por B. Radziszewski, em 1887, citado por ALBERTIN et al. (1998). Esses autores relataram que a lofina não emite luz quando aquecida na ausência de oxigênio mas, a sua reação de auto-oxidação é acompanhada por QL. A oxidação de luminol (5-amino-2,3-di-hidroftolazina-1,4-diona) com peróxido de hidrogênio em meio alcalino pH 10-11, mostrada na Figura 1.2, foi a primeira reação quimiluminescente bem caracterizada, descrita por H. O. Albrecht em 1928, citada por ALBERTIN et al. (1998). Sua reação com oxidantes fortes, em meio aquoso alcalino, gera uma luminescência azul, em torno de 420 nm. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o periodato de potássio (KIO_4) são dois tipos de oxidantes normalmente usados para oxidar o luminol em solução aquosa alcalina, produzindo uma luminescência azul, ZHOU et al. (1999).

Acilhidrazidas têm sido estudadas devido à capacidade de produzirem QL. Todos os compostos examinados contêm o grupo ativo -C-NH-NH-R, ISACSSON e WETTERMARK (1974).

O rendimento quântico do luminol não passa de 5% em dimetil sulfóxido e de 1,5% em sistemas aquosos, DODEIGNE et al. (2000). Assim, a reação de oxidação do luminol em meio aquoso ocorre na presença de um catalisador. Vários tipos de catalisadores, enzimáticos ou inorgânicos, são utilizados em trabalhos encontrados na literatura.

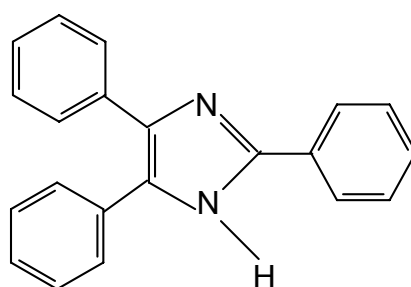


FIGURA 1.1 - Composto orgânico 2,4,5-trifenilimidazol (lofina) que mostra reação quimiluminescente.

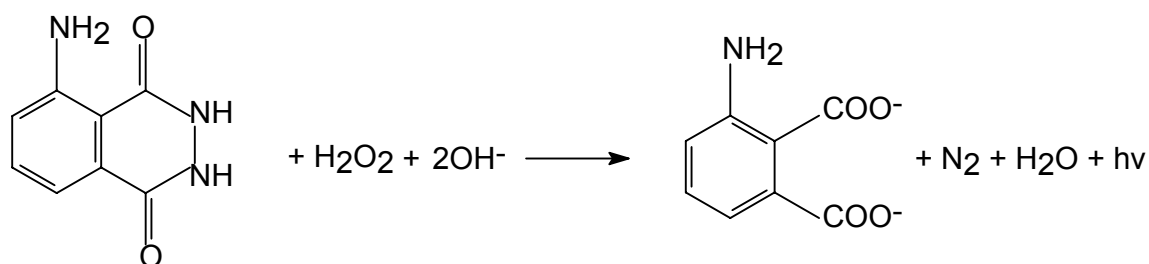


FIGURA 1.2 - Esquema simplificado da reação quimiluminescente do luminol, PALILIS e CALOKERINOS (2000).

Vários metais de transição catalisam o luminol, KRICKA e THORPE (1983). O hexacianoferrato (III) é um dos catalisadores mais utilizados, pois além de catalisar a reação, atua como co-oxidante. Segundo BOSTICK & HERCULES (1975), dentre os catalisadores inorgânicos, o hexacianoferrato (III) apresentou

melhor sensibilidade, boa faixa de resposta linear, em comparação com os demais íons estudados (Cu (II), Co (II), Ni (II) e $S_2O_8^{2-}$).

A medida de luz emitida por uma reação química ou bioquímica está relacionada com a concentração das espécies participantes, a produção total de luz está diretamente relacionada com a quantidade de luz emitida e, conseqüentemente, é proporcional à concentração da espécie em interesse. Por esta razão, a medida da luz emitida é um indicador da quantidade do analito presente, e o instrumento capaz de realizar estas medidas é chamado luminômetro. Existem quatro requisitos básicos para o detector que constituem a parte crítica do luminômetro, GARCÍA-CAMPAÑA et al. (2001): deve ser capaz de detectar um sinal luminoso de várias ordens de intensidade de magnitude (desde de poucos fótons por segundo a dezenas de milhões de fótons por segundo), ser sensível no mínimo na região espectral de 400-600 nm, especificamente na região do visível (380-750 nm) e regiões do ultravioleta e infravermelho, o sinal registrado pelo detector deve estar relacionado diretamente com a intensidade da luz produzida, deve ser facilmente registrada e analisada e, por último, a velocidade de resposta do detector deve ser mais rápida que a velocidade de reação quimiluminescente.

Uma das vantagens mais importantes da QL como técnica analítica é a simplicidade da instrumentação, cujos componentes principais são: célula de reação, compartimento isento de luz, dispositivo para introdução e mistura de soluções de reagentes e amostras, detector de luz e sistema de aquisição e processador de sinal. No compartimento coloca-se a célula de reação (tubo de ensaio, cela de fluxo, etc.) com o objetivo de que toda luminescência seja captada pelo detector. Esse compartimento deve estar fechado, impedindo a entrada da luz ambiente, para evitar possíveis interferências e precisa ser posicionado próximo ao detector para conseguir eficiência óptica máxima. Nas técnicas de quimiluminescência, inicia-se a reação quimiluminescente após a mistura dos reagentes e amostra, e a intensidade da emissão decresce à medida que os reagentes são consumidos.

1.3.2 - Aplicações

Nos últimos anos, o interesse pelo uso de sistemas quimiluminescentes em química analítica (incluindo o campo de análises farmacêuticas) vem crescendo

exponencialmente, principalmente na fase líquida e gasosa. Entretanto, as aplicações na fase sólida são mais limitadas. Algumas aplicações dos sistemas quimiluminescentes são apresentadas na Tabela 1.1.

TABELA 1.1 - Principais aplicações comuns dos sistemas quimiluminescentes, GARCÍA-CAMPAÑA et al. (2001).

fase	analito(s)	Reagente
gasosa	O ₃	etileno
gasosa	hidrocarbonetos NO	O ₃
gasosa	nitrosaminas nitrogênio total	O ₃ depois de converter o analito a NO
gasosa	compostos de SO _x	Chama de H ₂
gasosa	compostos de SO _x	chama de H ₂ seguida por O ₃
líquida	Co (II), Cu (II), Fe (III), Zn (II), Cd (II), Mn (II), Cr (III), Cr (IV), glicose, ácido ascórbico, ácido carboxílico, aminas, etc.	luminol e derivados
líquida	aminas alifáticas	Ru(bpy) ₃ ³⁺
líquida	oxidantes (H ₂ O ₂ , etc.) hidrocarbonetos aromáticos policíclicos aminas alifáticas, ácidos carboxílicos	Peroxioxalatos
líquida	Diferentes moléculas (geralmente em aplicações farmacêuticas)	Oxidação direta com MnO ₄ ⁻ , ClO ⁻ , Ce (IV), IO ₄ ⁻
sólida	Polímeros	O ₂ e calor

SEITZ e HERCULES (1972) determinaram traços de Fe (II) usando detecção quimiluminescente. A análise de traços de metais, baseada na reação com o luminol é rápida, mais sensível do que os métodos colorimétricos e requer instrumentação simples. Os autores exploraram a determinação de Fe (II) em águas naturais, baseando-se no método da oxidação do luminol na presença de oxigênio dissolvido. Em meio aquoso alcalino, o oxigênio oxida rapidamente o Fe (II) para hidróxido férrico. Altas concentrações de ligantes orgânicos reduzem a intensidade de luz catalisada pelo Fe(II), mas não afeta a linearidade de resposta. O limite de detecção para o Fe(II) foi de $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$, e a resposta linear foi até $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

O 4-(5', 6'-dimetoxibenzotiazol)ftalhidrazida (DBPH), reagente quimiluminescente altamente sensível foi sintetizado por ISHIDA et al. (1995). O reagente consiste de ftalhidrazida e benzotiazol moídos, que geram forte quimiluminescência pela reação com peróxido de hidrogênio na presença de hexacianoferrato de potássio (III) ou peroxidase. A intensidade da quimiluminescência de DBPH foi cerca de 20 vezes maior que a do luminol. O limite de detecção para a determinação de DBPH foi de $1,3 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$. A mesma reação foi aplicada na determinação de peróxido de hidrogênio por injeção em fluxo.

Um sensor quimiluminescente para vitamina B₁₂ combinado com a análise por injeção em fluxo foi proposto por QIN et al. (1997). Esse procedimento baseou-se no efeito catalítico do cobalto (II), liberado pela acidificação da vitamina B₁₂, na reação quimiluminescente entre o luminol, que foi imobilizado eletrostaticamente numa coluna de troca aniônica, e o peróxido de hidrogênio gerado eletroquimicamente no eletrodo. O sensor respondeu linearmente para concentrações de vitamina B₁₂ na faixa de $1,0 \times 10^{-3}$ a 10 mg L^{-1} , e o limite de detecção foi de $3,5 \times 10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$, com um desvio padrão de 3,5%. O sistema foi estável para 500 determinações e foi aplicado com sucesso para a determinação de vitamina B₁₂ em compostos farmacêuticos.

Um método de injeção em fluxo com detecção quimiluminescente foi avaliado por ZHOU et al. (1999), para a determinação de peróxido de hidrogênio, glicose e ácido ascórbico em tabletes de vitaminas e injeções. O peróxido de hidrogênio foi diretamente determinado pelo sistema quimiluminescente luminol-KIO₄-H₂O₂. O limite de detecção foi de $3,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e o desvio padrão relativo de 1,1% para $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (n=11). A glicose foi indiretamente determinada através da medida do peróxido de hidrogênio gerado pela oxidação da glicose, na

presença da glicose oxidase em pH 7,6. A QL foi correlacionada linearmente com a concentração de glicose entre 0,6 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O desvio padrão relativo e o limite de detecção da glicose foram 2,1% para 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (n=11) e 0,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O ácido ascórbico também foi indiretamente determinado pela supressão do sistema quimiluminescente luminol-KIO₄-H₂O₂. A curva de calibração foi linear acima da faixa de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de ácido ascórbico, o desvio padrão relativo foi de 1,0% para $8,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (n=11) e o limite de detecção de $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

A determinação de hidrocloreto de fenilefrina em compostos farmacêuticos, por injeção em fluxo usando detecção quimiluminescente, foi proposta por MESTRE e ZAMORA (2001). O método baseou-se na oxidação da droga pelo permanganato de potássio em meio ácido a 80 °C. Esse método apresentou boa sensibilidade, baixo limite de detecção (20 $\mu\text{g L}^{-1}$) e alta reprodutibilidade. Uma resposta linear entre 0,03 e 8 mg L⁻¹ foi observada, com desvio padrão relativo de 1,1% e frequência analítica de 134 determinações por hora. A influência de 38 interferentes foi avaliada, e o método foi aplicado na determinação de hidrocloreto de fenilefrina em diferentes compostos farmacêuticos.

1.4 - Enzimas, métodos de imobilização e suas aplicações analíticas

1.4.1 - Enzimas

A catálise biológica tem sido usada desde tempos imemoriais para produzir uma variedade de alimentos e bebidas. Todavia, o início da investigação científica sobre a natureza desses processos é recente, e está ligado aos nomes de Berzelius, Pasteur, Liebig, Van't Hoff, Kuhne e Buchner, entre outros.

Muitos dos estudos iniciais sobre enzimas resultaram da observação da fermentação alcoólica e das putrefações. Willis, em 1659, e Stahl, em 1697, tentaram explicar a fermentação como “um processo em que um corpo no estado de ação interna comunica esse movimento a outro corpo que é, então, fermentado”. Fabroni, em 1787, definiu fermentação como a decomposição de uma substância por outra substância. Embora Van Leeuwenhoek tivesse descrito, em 1680, a

observação microscópica de células de levedura, a sua descoberta ficou no esquecimento durante mais de um século. Schwann, em 1837, atribuiu a putrefação à presença de bactérias vivas, e Kutzing afirmara que a fermentação alcoólica era causada pelas leveduras. O primeiro reconhecimento experimental da existência de uma enzima deve-se a Payen e Persoz ao observarem, em 1833, que o precipitado produzido pelo álcool num extrato de malte continha uma substância termolábil que convertia o amido em açúcar. Esta substância foi designada por diastase, devido ao poder de separar substâncias solúveis de grãos de amido. O termo diastase veio, posteriormente, a ser utilizado como designação geral das enzimas, RICARDO e TEIXEIRA (1993).

Dois cientistas começaram a divergir sobre a fermentação, Liebig em 1839, citado por WHITAKER (1972), considerava a fermentação como um processo explicável numa base puramente química, enquanto Louis Pasteur acreditava na presença de células vivas. Com isso, surgiram os nomes fermentos organizados e fermentos desorganizados, conhecidos atualmente por microorganismos e extratos enzimáticos, respectivamente.

O termo enzima só foi introduzido em 1878, por Kuhne, que pretendia evitar o uso das designações pouco satisfatórias de fermentos organizados e fermentos desorganizados que vigoravam na altura. Em 1897, Buchner acabou com a controvérsia Liebig-Pasteur ao mostrar a possibilidade da fermentação na ausência de células vivas, WHITAKER (1972).

Atualmente, é aceito que todas as enzimas são proteínas, considerando que a ação catalítica é uma das mais importantes funções das proteínas. Assim, as enzimas são, em sua grande maioria, proteínas que catalisam com grande eficiência as reações biológicas, acelerando em média de 10^9 a 10^{12} vezes a velocidade das reações metabólicas sob diversas condições de pH, temperatura, meio iônico, entre outros. As enzimas atuam ainda como reguladores deste complexo de reações e são, portanto, consideradas as unidades funcionais do metabolismo celular. Toda enzima possui um centro ativo, local onde se processam as reações com determinado substrato. O centro ativo é, geralmente, constituído de alguns resíduos de aminoácido da cadeia protéica e de um grupo não protéico, sendo responsável pela atividade biológica da enzima. Algumas enzimas dependem somente de sua própria estrutura como proteína para exercer sua atividade, enquanto outras necessitam também de um ou mais componentes não protéicos

chamados de cofatores, que podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas denominadas coenzimas. O complexo ativo enzima-cofator é denominado holoenzima, WHITAKER (1972), VOET e VOET (1995), LEHNINGER (1986), GRAHAM (1995), STRYER (1995).

O conceito da formação do complexo enzima-substrato surgiu da necessidade de explicar o fato das enzimas mostrarem um elevado grau de estereoespecificidade em relação aos seus substratos. A especificidade enzimática levou Fischer, em 1894, a propor uma relação análoga à da chave e da fechadura para a enzima e seus substratos. No entanto, foi Brown quem primeiro notou os efeitos experimentais da formação de tal complexo. Em 1903, Brown e Henri observaram o efeito da saturação da enzima com o substrato, e concluíram que toda enzima combina com o substrato e forma um complexo enzima-substrato, RICARDO e TEIXEIRA (1993).

Michaelis e Menten, em 1913, estabeleceram a teoria geral em que toda enzima, inicialmente, combina com o substrato, levando à formação de um complexo enzima-substrato. Em seguida, este complexo enzima-substrato ES sofre dissociação formando o produto P, regenerando a enzima E. As reações enzimáticas, envolvendo um único substrato, podem ser expressas pela equação: $E + S \leftrightarrow [ES] \rightarrow [EP] \rightarrow E + P$, em que E representa a enzima na forma livre, S o substrato, [ES] o complexo intermediário enzima-substrato, [EP] o complexo enzima-produto e P o produto formado, observados nas Figuras 1.3 e 1.4.

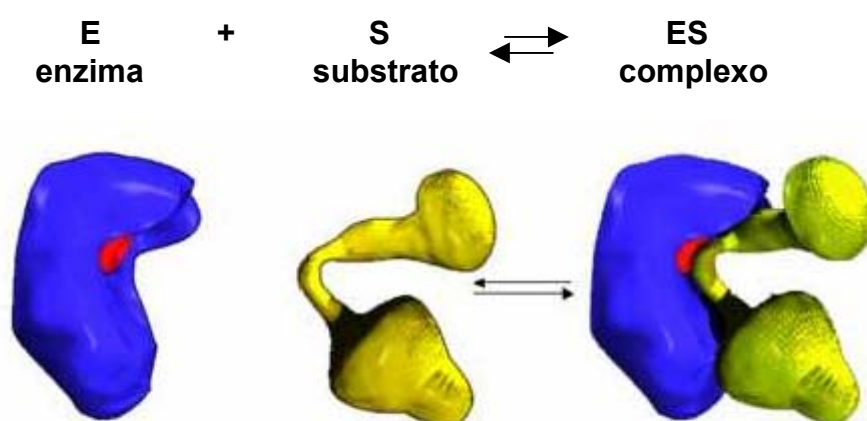


FIGURA 1.3 - Formação do complexo enzima-substrato.

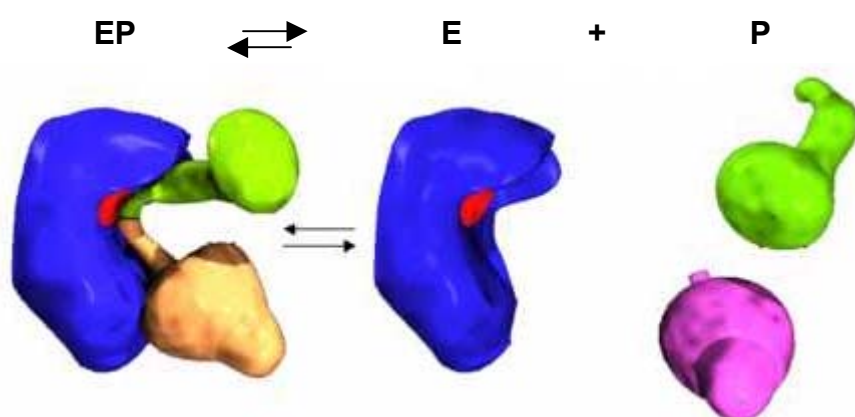


FIGURA 1.4 - Formação do complexo enzima-produto e produto.

A cinética de reação de uma enzima é estudada avaliando-se a concentração de produto formado, ou a concentração de substrato consumido, por unidade de tempo de reação. A atividade catalítica das enzimas é dependente das forças intramoleculares responsáveis pela manutenção da forma globular da proteína enzimática. Essas forças, na sua maioria, são fracas e facilmente anuláveis, ocorrendo, então, a desnaturação da proteína. A desnaturação pode resultar da ação de diversos agentes como calor, ácidos, álcalis, soluções salinas concentradas, solventes orgânicos, detergentes aniônicos, radiação ultravioleta, etc. Caso o tempo de atuação desses agentes não seja muito prolongado, a proteína poderá recuperar a configuração inicial (renaturação), quando o agente desnaturante for eliminado, RICARDO e TEIXEIRA (1993).

As enzimas apresentam um pH ótimo (Tabela 1.2), no qual tem atividade máxima. Acima e abaixo deste valor de pH a atividade decresce, resultando na formação de uma forma iônica imprópria do substrato ou da enzima, ou de ambos, na desnaturação da enzima ou na combinação desses efeitos, SUELTER (1985).

TABELA 1.2 - Exemplos de enzimas e seus valores de pH ótimo.

Enzima	fonte	pH ótimo
Pepsina	mucosa gástrica	1,5
<i>Sucrase</i>	intestino	6,2
Catalase	fígado	7,3
Arginase	fígado bovino	9,0
Fosfatase alcalina	osso	9,5

A atividade enzimática aumenta com o aumento da temperatura até atingir uma velocidade máxima, a partir da qual começa a decrescer. Com o aumento contínuo da temperatura poderá haver uma inativação gradativa da enzima até a desnaturação da proteína, causada pelo calor excessivo. Em geral, as enzimas agem lentamente a baixas temperaturas, e sua atividade aumenta com o acréscimo de temperatura, atingindo uma atividade ótima no intervalo entre 20 e 40 °C.

Além da enzima e do substrato, outras substâncias podem ser necessárias para a completa atividade da enzima. Estas substâncias são denominadas cofatores, e catalisam a reação da enzima com seu substrato. Vários cátions metálicos, tais como o cobre (II), manganês (II), ferro (III) e cobalto (II), agem como ativadores das enzimas. As duas unidades mais utilizadas para a medida de atividade enzimática ou catalítica são: unidade catalítica internacional (U ou U.I.), que corresponde à quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 μmol de substrato por minuto, em condições ótimas específicas para cada enzima, estabelecida pela União Internacional de Bioquímica (IUB). A outra unidade utilizada é o Katal, unidade expressa em mol/segundo, e corresponde à atividade catalítica necessária para, em condições pré-definidas, transformar 1 mol de substrato por segundo de reação, RICARDO e TEIXEIRA (1993).

As enzimas podem ser classificadas de acordo com vários critérios. O mais importante foi estabelecido pela IUB, e estabelece seis classes, RICARDO e TEIXEIRA (1993):

1 - Oxidorredutases: são enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja, reações de oxidação-redução. São as desidrogenases e as oxidases. $A_{\text{red}} + B_{\text{oxid}} \leftrightarrow A_{\text{oxid}} + B_{\text{red}}$

2 - Transferases: enzimas que catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc. Como exemplo temos as Quinases e as transaminases. $AB + C \leftrightarrow A + BC$

3 - Hidrolases: constituem uma classe bastante extensa de enzimas que têm como função primária o desdobramento de compostos por reação com água (hidrólise). As reações de hidrólise são praticamente irreversíveis, podendo representar-se por: $A + H_2O \leftrightarrow B + C$ Exemplos: lipases, esterases, peptidases e fosfatases

4 - Liasas: catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônio e gás carbônico. As desidratases e as descarboxilases são bons exemplos. $A \leftrightarrow B + C$

5 - Isomerases: esta classe inclui uma grande diversidade de enzimas, com capacidade para catalisar diferentes tipos de isomerizações. As epimerases são exemplos.

6 - Ligases: catalisam reações de formação de novas moléculas, a partir da ligação entre duas já existentes, sempre as custas de energia (ATP). São as sintetases. $X + Y + ATP + H_2O \leftrightarrow XY + AMP + H_4P_2O_7$

Os nomes sistemáticos das enzimas devem incluir os nomes dos seus substratos, o que torna inevitável que as designações sistemáticas sejam, por vezes, excessivamente longas, uma vez que muitos substratos são substâncias complexas, portanto, com nomes químicos também longos. Por esta razão pareceu à Comissão que a melhor solução era, tal como acontece na Botânica e Zoologia, ter dois tipos de designações para as enzimas: a designação sistemática e a de uso corrente ou trivial, RICARDO e TEIXEIRA (1993), PRINCE e LEWIS (1989). As enzimas podem ser classificadas segundo a Comissão Enzimática (EC) através de quatro números. O primeiro indica o tipo de reação catalisada, o segundo indica a subclasse que especifica o tipo de substrato ou o tipo de ligação clivada, o terceiro indica as subclasses, permitindo uma definição mais precisa da reação catalisada e o quarto indica o número de série da enzima dentro da subclasse, PRINCE e LEWIS (1989).

1.4.2 - Métodos de imobilização

A imobilização enzimática em matrizes inertes aparece como uma boa alternativa para manter a atividade catalítica e a estabilidade das enzimas, devido às enzimas em solução apresentarem limitações e desvantagens como instabilidade, baixa precisão, alto custo e a impossibilidade de recuperá-las para uma utilização posterior. Além disso, a enzima imobilizada torna-se menos susceptível à variação de temperatura, pH e à ação de ativadores e inibidores que atuam nas enzimas em solução, FATIBELLO-FILHO e CAPELATO (1992).

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.

1.4.2.1 - Ligação química covalente

Essa imobilização é realizada através de ligações covalentes com grupos funcionais não ativos da enzima, a grupos reativos (carbonila, hidroxila, amino, fenólico, tiol, imidazólico) na superfície do suporte insolúvel (esferas de vidro, amido, sefadex, celulose, dextrana, agar-agar, óxidos metálicos entre outros), FATIBELLO-FILHO e CAPELATO (1992). A vantagem é a simplicidade, a forte interação da enzima com o suporte, e a menor quantidade de enzima usada em relação aos outros métodos de imobilização.

1.4.2.1.1 - Imobilização em sílica de porosidade controlada

A sílica pode existir sob uma grande variedade de formas, sendo a fórmula mais simples SiO_2 . Sua estrutura é caracterizada por ser cristalina ou amorfa, fornecendo propriedades físicas e químicas específicas para sua superfície, WALCARIUS (1988), PERONE (1996). A sílica é um dos melhores suportes empregados para a imobilização de enzimas, pois é estável, inerte a ataques microbianos e de fácil manuseio, podendo ser encontrada na forma natural ou sintetizada em laboratório. A maioria das sílicas encontradas na natureza está na fase cristalina e as sintetizadas na fase amorfa, PERONE (1996).

A superfície da sílica consiste de inúmeros grupos silanóis, apresentando como fortes adsorventes, e grupos siloxanos que apresentam como agentes hidrofóbicos. Os silanóis podem existir na superfície sozinhos ou em formas geminais e vicinais, podendo ser desprotonados com amônia ou aminas orgânicas. O acoplamento de diversos grupos funcionais à superfície da sílica pode ser feito, devido à grande reatividade dos grupos silanóis, podendo-se adicionar agentes promotores de adesão, acoplamento, entre outros, WALCARIUS (1988).

O substrato organossilano mais utilizado para modificação da sílica é o aminopropiltriétoxisilano. A estrutura do polímero formado pode ser observado na Figura 1.5.

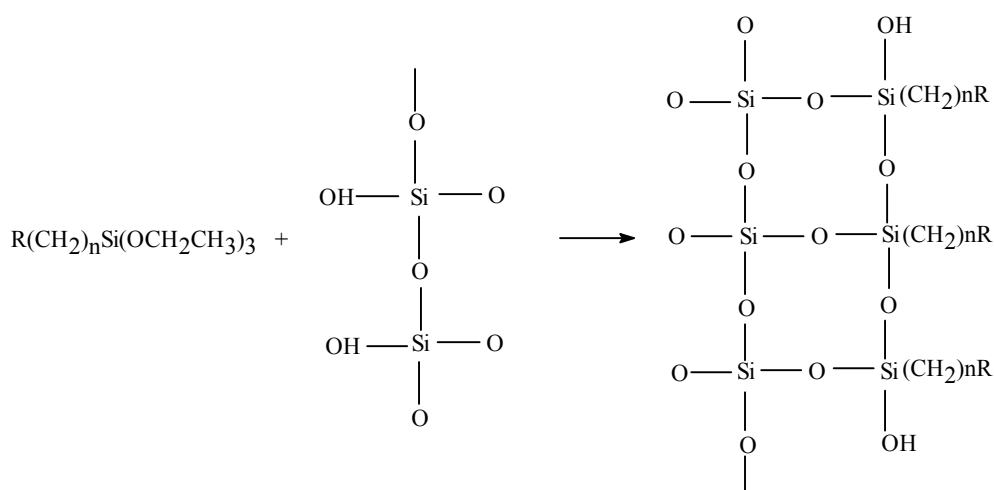


FIGURA 1.5 - Reação de formação do derivado 3-aminopropiltriétoxisilano, PERONE (1996).

1.4.2.2 - Ligação química covalente cruzada

Esse método consiste na utilização de agentes bifuncionais para formação de ligações covalentes cruzadas com as moléculas de enzima e ou moléculas do suporte inerte. O glutaraldeído é um dos reagentes mais utilizados que permite uma imobilização estável, rápida e de baixo custo, FATIBELLO-FILHO e CAPELATO (1992).

1.4.2.3 - Oclusão em gel

O aprisionamento das enzimas pode ser realizado em várias matrizes poliméricas, entre elas, agar-agar, poliacrilamida, amido, borracha de silicone, entre outros. Nesse processo de imobilização mistura-se o monômero, o catalisador e a enzima a ser ocluída em uma solução tampão. Os pequenos interstícios formados não permitem a passagem das moléculas de enzima, entretanto, apenas os tamanhos menores difundem-se livremente, FATIBELLO-FILHO e CAPELATO (1992).

1.4.2.4 - Adsorção física

Os principais tipos de interações envolvidas nesse processo são iônicas, polares, pontes de hidrogênio ou hidrofóbicas. As superfícies dos suportes são geralmente ativas e são utilizados adsorventes como alumina, sílica, grafite, sefadex e outras. A grande vantagem é a simplicidade do método, no entanto, a desvantagem mostra a susceptibilidade da enzima à variações de temperatura, pH, solvente e substrato, FATIBELLO-FILHO e CAPELATO (1992).

1.4.2.5 - Microencapsulação

As moléculas de enzima são confinadas em pequenas esferas de membranas semipermeáveis (5 a 300 μm), mantendo um alto grau de recobrimento da atividade enzimática, FATIBELLO-FILHO e CAPELATO (1992).

1.4.2.6 - Polimerização eletroquímica

Um outro tipo de imobilização pode ser feito com polimerização eletroquímica. Neste processo, um monômero apropriado é oxidado na presença da enzima. Este polímero pode ser condutor ou não, dependendo do monômero empregado. A enzima é confinada em uma camada adjacente ao eletrodo e então, a espessura do filme, o número de camadas e a concentração de enzimas por camada podem ser facilmente controlados com o potencial aplicado, e ou número de ciclos empregados (voltametria cíclica), CALVO e DANILOWICZ (1997).

1.4.3 - Aplicações analíticas

Desde a primeira publicação analítica, por Stetter em 1950, para a preparação de enzima impura, citado por MARKO-VARGA e DOMÍNGUEZ (1991), o uso das enzimas tem se tornado uma rotina e a viabilidade das enzimas para as análises de substrato tem sido demonstrada. Métodos analíticos, que utilizam enzimas, atualmente, têm sido aplicados em análises farmacêuticas, alimentos, agricultura, ambiental e industrial.

Um eletrodo para determinação de glicose em um produto farmacêutico foi desenvolvido por MAGNA et al. (1993). O eletrodo para glicose foi construído imobilizando glicose oxidase sobre uma membrana de acetato de celulose com glutaraldeído, montada sobre um eletrodo de tungstênio-óxido de tungstênio. Os íons H_3O^+ produzidos na reação enzimática foram detectados no eletrodo de tungstênio. Os efeitos da posição da camada de enzima, da quantidade de enzima, do pH, da capacidade tamponante e dos interferentes sobre a resposta do eletrodo, foram estudados. Para diferentes valores de pH, a resposta do eletrodo foi linear nas seguintes faixas de concentração: $2,81 \times 10^{-4}$ - $2,04 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (pH=4,7), $2,40 \times 10^{-4}$ - $1,66 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (pH=5,5), $2,48 \times 10^{-4}$ - $2,04 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (pH=6,0), $1,95 \times 10^{-4}$ - $1,59 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (pH=6,5), $2,20 \times 10^{-4}$ - $1,86 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (pH=6,8), $1,68 \times 10^{-4}$ - $2,04 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (pH=7,3) e $2,37 \times 10^{-4}$ - $1,86 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (pH=7,6) com inclinação de 56,2; 51,3; 47,7; 41,5; 33,9; 22,8 e 25,6 mV/década, respectivamente.

Um sistema em fluxo, baseado no conceito de multicomutação, foi desenvolvido por KRONKA et al. (1999) para a determinação de glicose e sacarose em sucos, empregando reações enzimáticas. A determinação foi baseada na reação com D-glicose produzindo peróxido de hidrogênio catalisado pela glicose oxidase (GOD). Posteriormente, o H_2O_2 produzido reagiu com o 4-aminafenazol e o fenol para formar o 4-(p-benzoquinona-monoimina)fenazol, detectado a 510 nm. Esta reação foi catalisada pela enzima peroxidase (POD). O sistema de fluxo consistiu de um conjunto de válvulas solenóides controlado por um microcomputador, equipado de interfaces eletrônicas. A precisão do método foi avaliada pela comparação com os resultados obtidos pelos procedimentos oficiais e não foi observada diferença significativa em nível de 95% de confiança. Outras vantagens foram uma faixa de resposta linear entre 0,05 e 0,20% (m/v) de glicose sem diluição prévia, consumo de

reagente de 336 μL por determinação e frequência analítica de 30 amostras por hora.

MARTELLI e colaboradores (2001) apresentaram um procedimento para determinação de lactato em iogurte por detecção quimiluminescente usando um espectrofotômetro UV-Vis como detector. A fonte da radiação foi interrompida e a cela de fluxo foi posicionada a 2 mm do fotodetector. A reação quimiluminescente foi obtida pela reação do luminol com o peróxido de hidrogênio, catalisada pelo hexacianoferrato (III), após reação com lactato. A enzima lactato oxidase foi imobilizada em esferas de vidro. O sinal gerado pela reação foi lido pelo microcomputador. As condições de imobilização, concentração da enzima, temperatura, pH, estabilidade do reator enzimático e as vazões de fluxo foram investigadas. Os resultados obtidos foram concordantes com o método convencional (Boehringer UV-KIT), não sendo observada diferença significativa em nível de 95% de confiança.

Em trabalho desenvolvido por LUCA e REIS (2001), é discutido o desenvolvimento de um procedimento espectrofotométrico em fluxo para a determinação de uréia em plasma de sangue animal, empregando fonte natural de urease, e a quantificação dos íons amônio produzidos através da reação de Berthelot. As potencialidades do emprego de algumas leguminosas foram avaliadas no sentido de se selecionar a espécie mais adequada para a proposta analítica. A mini-coluna foi preenchida com fragmentos de leguminosas e acoplada ao sistema FIA, onde a uréia foi convertida *on-line* para íons amônio e subsequente quantificação pelo espectrofotômetro. A coluna enzimática apresentou boa estabilidade, obtendo-se 30 determinações por hora. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos pelo procedimento oficial e não foi observada diferença significativa em nível de 90% de confiança. Outros aspectos favoráveis observados foram desvio padrão relativo de 1,4% (n=12), baixo consumo de reagentes por determinação, e a pequena manipulação das soluções de reagentes e amostra.

1.5 - Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de procedimentos automatizados em fluxo para as determinações de 3-hidroxiacetato, glicose e colesterol em soro de sangue animal empregando multicomutação e reações enzimáticas.

Com a automatização dos procedimentos pretende-se minimizar a manipulação das amostras, diminuir o consumo de reagentes e aumentar a frequência analítica com uma maior precisão nas medidas. Através destas características analíticas, busca-se facilidade operacional com baixo custo de instrumentação para os procedimentos, visando potencializar suas aplicações em análises de rotina.

CAPÍTULO 2. SISTEMA DE ANÁLISES EM FLUXO EMPREGANDO MULTICOMUTAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE 3-HIDROXIBUTIRATO EM SORO DE SANGUE ANIMAL*

2.1 - Introdução

A determinação de 3-hidroxiacetil-CoA em fluidos biológicos é requerida em diagnósticos clínicos, pois reflete o balanço entre a mobilização da gordura (sintetiza a gordura do leite) e a capacidade do animal de utilizar as fontes de energia produzidas pelo fígado, como resultado tem-se o metabolismo de depósitos de gordura, JOINT FAO/IAEA PROGRAMME (1993b). O 3-hidroxiacetil-CoA é uma das principais fontes de energia para os animais, ajudando na digestão da celulose, além do fornecimento de energia para a movimentação do animal. No controle da saúde e nutrição de animais, e mesmo no desenvolvimento de novas pesquisas ligadas a esse segmento, a determinação desse parâmetro metabólico é normalmente executada empregando-se procedimento manual de análises, cujos reagentes são adquiridos na forma de *kit* comercial. As pesquisas nessa área requerem a análise de um elevado número de amostras, resultando em demora na obtenção dos resultados e maior quantidade de trabalho a ser executado. Além desses aspectos abordados, os materiais empregados, como tubos de ensaio e vidrarias em geral, necessitam de descontaminação, para minimizar o risco de contaminação da amostra.

No presente trabalho, pelas razões mencionadas, projetou-se um sistema de análise em fluxo visando à determinação de 3-hidroxiacetil-CoA em soro de sangue animal. O sistema foi desenvolvido baseando-se no conceito de multicomutação, cujas características principais favorecem análises de elevados números de amostras, com menor consumo de reagente do que em procedimentos usuais.

* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(9): 2457, 2003

Este capítulo teve por objetivo minimizar a manipulação das amostras e o volume de efluentes gerado e, atingir uma maior rapidez no processamento das análises e obtenção dos resultados.

2.2 - Revisão de literatura

2.2.1 - Aspectos gerais

Nas regiões tropicais e subtropicais, em sistema de manejo de baixo investimento, as dietas dos animais são freqüentemente deficientes em nutrientes, principalmente no período de seca, tornando necessária a suplementação. O suplemento alimentar tem mostrado melhoria na qualidade da dieta animal, KAITHO et al. (1998). Considerando esse fato, para EKMAN (1976) as deficiências nutricionais podem refletir na composição química do sangue. PAYNE e PAYNE (1987) sugerem a quantificação de alguns constituintes bioquímicos encontrados no sangue animal e, entre eles, o 3-hidroxiacetato é citado.

O 3-hidroxiacetato é um importante metabólito que participa do metabolismo da glicose, sendo também um importante parâmetro no estado de desnutrição do animal, SILVA e PANNALL (1984). Assim, a determinação de 3-hidroxiacetato pode ser importante na investigação de desordens do metabolismo de ácido acético, MARSHALL e ALBERTI (1987).

A produção de corpos cetônicos em ovelhas tem sido investigada extensivamente, desde que esses animais são mais propensos a cetose que os animais não-ruminantes, KOUNDAKJIAN e SNOSWELL (1970).

Segundo Annison et al. (1963), citado por SILVA e LEÃO (1979), foi observado aumento na concentração de açúcar no sangue após a ministração de 3-hidroxiacetato. Desse fato, originou a idéia de que acetato e corpos cetônicos podem afetar a síntese de glicose através da conversão direta de acetona para um composto intermediário de três carbonos no processo de síntese.

A ministração de 3-hidroxiacetato pode ter apenas um efeito na economia de glicose no corpo animal. Acetoacetato, parcialmente oriundo do 3-hidroxiacetato, tem um efeito estimulante sobre a gliconeogênese, principalmente

na ativação da enzima piruvato carboxilase. O 3-hidroxibutirato compete com a glicose no metabolismo oxidativo através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

2.2.2 - Significado clínico da concentração de 3-hidroxibutirato em soro de sangue animal

Os níveis de referência de 3-hidroxibutirato, usualmente adotados no soro sanguíneo animal, situam-se entre 35 e 139 mg L⁻¹ para animais não lactantes e em lactação, respectivamente, JOINT FAO/IAEA PROGRAMME (1993b). Os níveis de referência, adotados para cada espécie, indicam as quantidades mínimas e máximas necessárias ao bom desenvolvimento e saúde do animal. Esses valores são estabelecidos através de coletas de amostras de sangue de um grupo de animais clinicamente sadios, durante o período de um ano, KANEKO (1989).

Alterações na concentração de 3-hidroxibutirato podem ser devidas a vários fatores, tais como variações climáticas, estresse do animal, deficiência na dieta, lactação, inadequada quantidade de carboidrato ingerida e presença de cetonas no sangue.

Em condições de desnutrição do animal, a concentração de 3-hidroxibutirato no sangue é maior que os valores de referência, indicando uma inadequada quantidade de carboidrato ingerida e acetonemia clínica. A acetonemia ou cetose caracteriza-se pelo aumento dos corpos cetônicos nos fluidos orgânicos. Como consequência, há uma diminuição na produção de leite, perda rápida de peso, alta concentração de triglicérides no fígado e o surgimento de doenças como hipofagia (falta de apetite), hipercetonemia, hipoglicemia, hipoinsulinemia e letargia (abatimento físico), JOINT FAO/IAEA PROGRAMME (1993b), LEAN et al. (1991), EMERY et al. (1964), VEENHUIZEN et al. (1991). Além do impacto sobre a produção de leite, a acetonemia pode afetar o desempenho reprodutivo dos animais. ROINE e SALONIEMI (1978) concluíram existir correlação entre a incidência de acetonemia e a infertilidade.

Assim, a concentração de 3-hidroxibutirato em sangue animal é um importante parâmetro metabólico que pode ser usado para diagnosticar o estado de saúde e nutricional do animal.

2.2.3 - Métodos analíticos para a determinação de 3-hidroxiacetato

PALLESCHI e RATHORE (1988) propuseram um método amperométrico para a determinação de 3-hidroxiacetato. A enzima 3-hidroxiacetato desidrogenase foi imobilizada em eletrodo de grafite para a determinação indireta pelo NADH. Vários procedimentos foram testados para a imobilização e o mais satisfatório foi obtido empregando a adsorção na superfície do eletrodo. Entretanto, o eletrodo apresentou uma estabilidade de apenas três dias. Os autores empregaram potencial de +300 mV vs Ag/AgCl. O 3-hidroxiacetato, em tampão fosfato pH 7,5, foi determinado na faixa entre 5 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, observando-se um limite de detecção de 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os interferentes foram minimizados pela diluição das amostras.

Um método eletroquímico para a determinação de 3-hidroxiacetato em sangue e plasma foi descrito por McNEIL et al. (1990). O NAD^+ e a enzima 3-hidroxiacetato desidrogenase foram imobilizadas em eletrodos de carbono. O estado de oxidação produzido pelo NADH, gerado enzimaticamente, foi medido em +150 mV vs Ag/AgCl na faixa entre 1 μmol e 10 mmol, com desvio padrão relativo de 2,6% (n=20). A estabilidade do eletrodo com as enzimas imobilizadas foi de aproximadamente três meses. Os resultados de amostras de sangue obtidos pelo método amperométrico foram comparados com os resultados obtidos por análises espectrofotométricas, apresentando correlação definida pela inclinação da regressão linear ($y = 0,86x + 0,004$, $r = 0,99$).

KIBA et al. (1994a) desenvolveram um método fluorimétrico por injeção em fluxo para a determinação de 3-hidroxiacetato em soro, com enzima 3-hidroxiacetato desidrogenase imobilizado em reator. A enzima 3-hidroxiacetato desidrogenase foi imobilizada em esferas de álcool polivinílico acondicionadas numa coluna (4 cm x 4 mm d.i.). O NADH formado foi medido a 465 nm (excitado em 340 nm). A curva analítica foi linear entre 0,7 e 500 μmol de 3-hidroxiacetato, limite de detecção de 0,5 μmol e frequência analítica de 30 determinações por hora.

Um sistema de injeção em fluxo, com co-imobilização da enzima em reator, foi proposto por KIBA et al. (1994b) para a determinação de 3-hidroxiacetato. As enzimas 3-hidroxiacetato desidrogenase e NADH oxidase foram imobilizadas em esferas de álcool polivinílico e acondicionadas em coluna de aço inoxidável (5 cm x 4 mm d.i.). As amostras de soro foram diluídas 10 vezes em tampão borato, pH 9,4.

O peróxido de hidrogênio produzido foi detectado por quimiluminescência baseada na reação luminol - hexacianoferrato (III). A curva analítica foi linear na faixa entre $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, limite de detecção de $8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e frequência analítica de 30 determinações por hora.

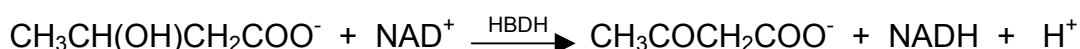
KIBA et al. (1995) desenvolveram um método de análise em fluxo para a determinação simultânea de glicose e 3-hidroxiacetato em amostras de soro e plasma, utilizando enzimas imobilizadas em esferas de álcool polivinílico. Para as determinações de glicose e 3-hidroxiacetato foram utilizadas as enzimas glicose desidrogenase e 3-hidroxiacetato desidrogenase, respectivamente, e a enzima NADH oxidase para ambas as determinações. O peróxido de hidrogênio produzido pelas reações enzimáticas foi detectado por quimiluminescência, utilizando os reagentes luminol e hexacianoferrato (III). No procedimento proposto foi observada linearidade entre 1×10^{-6} e $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para 3-hidroxiacetato, e 1×10^{-5} e $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para glicose, desvio padrão relativo inferior a 2,9% e frequência analítica de 30 determinações por hora.

Um sistema cromatográfico líquido, consistindo de co-imobilização em reator de 3-hidroxiacetato desidrogenase - NADH oxidase, imobilização de piranose oxidase em série e um quimiluminômetro, foi desenvolvido por KIBA et al. (1997), para a determinação simultânea de glicose, 1,5-anidroglicitol e 3-hidroxiacetato em plasma. As enzimas foram imobilizadas em esferas de álcool polivinílico e a separação foi feita através de uma coluna de gel SAX (40 mm x 4 mm d.i.) e, como eluente, foi utilizada uma solução de $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaOH}$ contendo 30 mmol L^{-1} de acetato de sódio. O peróxido de hidrogênio produzido foi detectado por quimiluminescência. A curva analítica apresentou resposta linear nas faixas entre 0,8 e $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ (7 ng e 4 μg) para glicose, entre 0,8 e $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ (7 ng a 3 μg) para 1,5-anidroglicitol e entre 1 e $700 \mu\text{mol L}^{-1}$ (5 ng a 4 μg) para 3-hidroxiacetato. A frequência de amostragem foi de 4 determinações por hora e as enzimas foram estáveis por 10 dias.

2.3 - Parte experimental

2.3.1 - Princípio do método

O método empregado para a determinação de 3-hidroxiacetato, em soro sanguíneo animal, baseou-se na redução de dinucleotídeo adenina nicotinamida (NAD⁺), conforme a equação descrita a seguir:



O 3-hidroxiacetato foi oxidado pela coenzima dinucleotídeo adenina nicotinamida (NAD⁺), em presença da enzima 3-hidroxiacetato desidrogenase (HBDH), formando o produto acetoacetato e o NADH, monitorado em 340 nm. A quantidade de NADH produzida é diretamente proporcional à concentração 3-hidroxiacetato na solução.

2.3.2 - Materiais

2.3.2.1 - Equipamentos e acessórios

O sistema consistiu de um espectrofotômetro Femto, modelo 700 Plus, equipado com cela de fluxo (caminho óptico de 1 cm e volume interno de 80 µL), 3 válvulas solenóides de três vias Nresearch 161T031 (W. Caldwell, NJ), tubos de polietileno com 0,8 mm de diâmetro interno, empregados na confecção de linhas de transmissão, reatores helicoidais e conectores em acrílico em forma de "T". As válvulas solenóides foram controladas por um microcomputador 586, equipado com interface de controle PCL-711S da American Advantech Corp. (San Jose, CA). Uma bomba peristáltica Ismatec, modelo IPC-8 (Glattbrugg, Switzerland), com velocidade variável e equipada com tubos de bombeamento de Tygon[®] de diferentes diâmetros internos, foi empregada para propulsão das soluções. Uma mini-coluna de 15 mm x 5 mm de diâmetro interno foi confeccionada em acrílico para o acondicionamento das esferas de vidro contendo a enzima imobilizada. O programa

utilizado para controle das válvulas solenóides e do espectrofotômetro para a aquisição de dados foi desenvolvido em linguagem Quick BASIC 4.5.

Equipamentos complementares utilizados foram: sistema a vácuo para coleta de sangue animal, centrífuga Centra - 7R (6000 rpm), banho com temperatura controlada FANEM[®] (modelo 102), pipetadores automáticos para micro-volumes, ponteiros de micropipetas para volumes entre 20 a 5000 μL , suporte para tubos de ensaio, tubos de ensaio com volume interno de 10 mL e cubeta de quartzo com volume interno de 4 mL.

2.3.2.2 - Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água purificada (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) obtida pelo sistema Milli-Q. As amostras e soluções foram estocadas em frascos de polietileno.

Solução estoque contendo 500 mg L^{-1} de 3-hidroxiacetato foi preparada dissolvendo-se 0,5 g a partir do sal 3-hidroxiacetato em água. Soluções de referência contendo 10, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 mg L^{-1} de 3-hidroxiacetato foram preparadas em água por diluições apropriadas da solução estoque e mantidas sob refrigeração a 5°C , quando não estava em uso.

Solução $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de dinucleotídeo adenina nicotinamida (NAD^+) foi preparada diariamente, dissolvendo-se 0,2322 g de NAD^+ em 50 mL de solução tampão pH 9,3, consistindo de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de glicina, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH.

Solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato pH 7,0 foi preparada dissolvendo-se 13,6 g de KH_2PO_4 em água. O valor do pH foi ajustado com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH e o volume foi completado para 1000 mL.

Solução de enzima 3-hidroxiacetato desidrogenase, *Rhodobacter Spheroids* (Boehringer), foi preparada dissolvendo-se 5,0 mg (600 U, 1,0 mL) de HBDH em 10 mL de solução $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato pH 7,0.

Kit comercial, para a determinação do 3-hidroxiacetato, SIGMA Diagnostics (1994) catálogo número 310-A, contendo 12 frascos de soluções, foi usado para comparação dos resultados com o sistema de injeção em fluxo proposto. O kit comercial é composto de 10 frascos de reagente de 3-hidroxiacetato contendo

NAD⁺ 4,6 mmol L⁻¹, ácido oxâmico e tampão pH 7,6, 1 frasco contendo solução de HBDH 50 U mL⁻¹, com tampão e estabilizadores e, o último frasco contendo uma solução de padrão de 3-hidroxiacetato 50 mg L⁻¹. Os reagentes foram armazenados a temperatura de 5 °C, conforme instruções anexadas ao *kit*.

2.3.3 - Imobilização enzimática

A enzima 3-hidroxiacetato desidrogenase foi imobilizada *on line* em esferas de vidro (aminopropil), porosidade de 170 Å e 200-400 mesh, de acordo com o procedimento descrito por KIBA et al. (1994a).

Uma massa de aproximadamente 0,1 g de esferas de vidro foi acondicionada numa mini-coluna de acrílico (15 mm x 5 mm d.i.). Uma solução 2% (v/v) de glutaraldeído em solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato pH 7,0 foi bombeada por 3 h através da mini-coluna contendo o aminopropil, mantida a uma temperatura de 21 °C (temperatura do ambiente). Após essa etapa, a coluna foi lavada com água degaseificada por 30 min, e solução de enzima 3-hidroxiacetato desidrogenase (600 U) foi bombeada em circuito fechado, durante 6 h, mantendo a temperatura a 21 °C. Após o término da imobilização, a coluna enzimática foi mantida em solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato pH 7,0, sob refrigeração a 5 °C.

2.3.4 - Recomendações e procedimento para coleta de amostras de sangue animal

Alguns cuidados devem ser observados para garantir a integridade física e química do material coletado, utilizando-se procedimentos adequados de custódia, manuseio, identificação e acondicionamento, desde a coleta no campo até a recepção no laboratório. Deve-se identificar, com letras legíveis, o recipiente (tubo de ensaio) que receberá a amostra de sangue, garantir que os utensílios empregados na coleta não contaminem a amostra, principalmente em função das determinações que serão realizadas. Cada etapa da coleta deve ser documentada. A amostra deve ser encaminhada rapidamente ao laboratório, para que possa ser devidamente processada e armazenada. É necessário que as amostras sejam

conservadas em baixas temperaturas ($-5\text{ }^{\circ}\text{C}$), quando as determinações não forem realizadas imediatamente após a coleta, NOGUEIRA et al. (1998).

As amostras de sangue animal foram coletadas conforme procedimentos recomendados por CHRISTIAN (1986), JOINT FAO/IAEA PROGRAMME (1993a) e NOGUEIRA et al. (1998), cujos detalhes são transcritos a seguir.

Para a obtenção do soro, as amostras de sangue foram coletadas diretamente da veia jugular dos animais, utilizando-se agulhas de calibre 18 para prevenir hemólise. As amostras foram coletadas de ovinos e bovinos mantidos pelo Laboratório de Nutrição Animal (CENA-USP) e pelo Departamento de Zootecnia (ESALQ-USP). As amostras de sangue foram recolhidas em tubos de ensaio tipo Vacutainer® (10 mL), previamente esterilizados a vácuo. Após a coleta, o tubo foi invertido cuidadosamente e deixado em repouso durante 24 h, à temperatura ambiente ($21\text{ }^{\circ}\text{C}$), para que ocorresse a coagulação e a separação do soro. Uma vez separado o soro (4 mL) do sangue, o mesmo foi removido com o auxílio de pipetador automático e transferido para outro tubo esterilizado, que foi centrifugado por 10 min a 2500 rpm, para se ter uma separação mais adequada. As amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento da análise. Observou-se nas amostras de soro sanguíneo coloração amarelada, indicando que não houve hemólise.

A hemólise é a destruição de células vermelhas, com a liberação da hemoglobina e outras células constituintes do fluido (soro ou plasma), CHRISTIAN (1986). Quando uma amostra de soro é submetida à análise, uma série de fatores pode levar a resultados poucos exatos. Soros hemolizados ou lipêmicos não são apropriados para a realização de dosagens bioquímicas, e os resultados obtidos podem variar muito de acordo com o método ou a aparelhagem utilizada e em relação aos parâmetros normais, O'NEILL e FELDMAN (1989).

Para a análise de 3-hidroxiacetato no soro ou plasma, as amostras são estáveis durante 7 dias a temperatura ambiente ($18 - 26\text{ }^{\circ}\text{C}$) e 14 dias sob refrigeração ($2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$), LI et al. (1980), CUSTER et al. (1983).

2.3.5 - Procedimento em fluxo

2.3.5.1 - Descrição geral do sistema

O diagrama de blocos representativo do sistema de análise por injeção em fluxo, empregado na determinação de 3-hidroxi-butanato em soro de sangue animal, é mostrado na Figura 2.1. Um microcomputador 586, equipado com uma interface eletrônica (Advantech Corp., PCL-711S) foi utilizado para controle e aquisição de dados.

Válvulas solenóides de três vias (Nresearch 161T031) foram empregadas para a construção do módulo de análises. O controle desses dispositivos pelo microcomputador foi feito através da interface PCL-711S. Para o acionamento das válvulas solenóides utilizou-se uma interface de potência de 12 V e intensidade de corrente de 100 mA.

A movimentação das soluções foi realizada empregando-se uma bomba peristáltica (Ismatec, IPC-8) equipada com tubos de propulsão de Tygon® de diferentes diâmetros. Empregaram-se tubos de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm para a construção dos reatores helicoidais. A conexão entre os pontos de entrada de soluções foi feita empregando confluências feitas em acrílico, em forma de "T".

O programa desenvolvido para o controle dos dispositivos de comutação foi escrito em linguagem Quick BASIC 4.5.

Na execução do programa foram requeridas as variáveis tais como duração do intervalo de tempo de acionamento das válvulas solenóides, tempo de leitura e número de replicatas. Realizada essa etapa de solicitação de dados, o microcomputador assumia o controle do processo analítico.

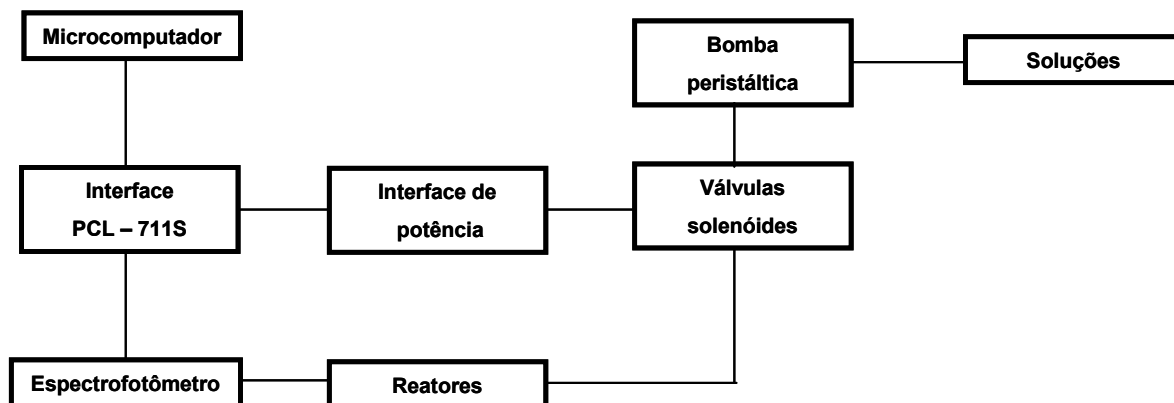


FIGURA 2.1 - Diagrama de blocos do sistema com multicomutação empregado na determinação de 3-hidroxiacetato.

2.3.5.2 - Descrição do módulo de análise para a determinação de 3-hidroxiacetato

O sistema em fluxo, baseado no conceito de multicomutação, projetado para a determinação de 3-hidroxiacetato em soro sanguíneo animal, é apresentado na Figura 2.2. Nessa configuração, todas as válvulas V_1 , V_2 e V_3 estão desligadas, e apenas a solução transportadora (C) está fluindo através do percurso analítico (reator tubular helicoidal (B) e coluna enzimática (HBDH)), em direção ao detector (DET), que é um espectrofotômetro UV/Vis, enquanto as soluções de amostra (A) e reagente (R) estão sendo recuperadas. As alíquotas de soluções de amostra e reagente são introduzidas no percurso analítico através dos pontos de confluências x e y, pelo acionamento das válvulas V_1 , V_2 e V_3 , em intervalos previamente definidos. Para a análise de soro sanguíneo animal, as válvulas V_1 , V_2 e V_3 foram ligadas ao mesmo tempo, por um período de tempo de 10 s, conforme mostrado nos diagramas de tempo T_1 , T_2 e T_3 . Durante o acionamento das válvulas, a solução transportadora estava sendo reciclada e, as soluções de amostra e reagente estavam sendo introduzidas no percurso analítico. Após a introdução das soluções, todas as válvulas são desligadas, a solução transportadora volta a fluir no percurso analítico com o deslocamento da zona da amostra e reagente em direção ao detector, passando pela coluna contendo a enzima (HBDH) imobilizada em esferas de vidro, onde ocorria o desenvolvimento da reação. O produto formado foi monitorado espectrofotometricamente a 340 nm e, o sinal gerado foi proporcional à concentração de 3-hidroxiacetato na amostra.

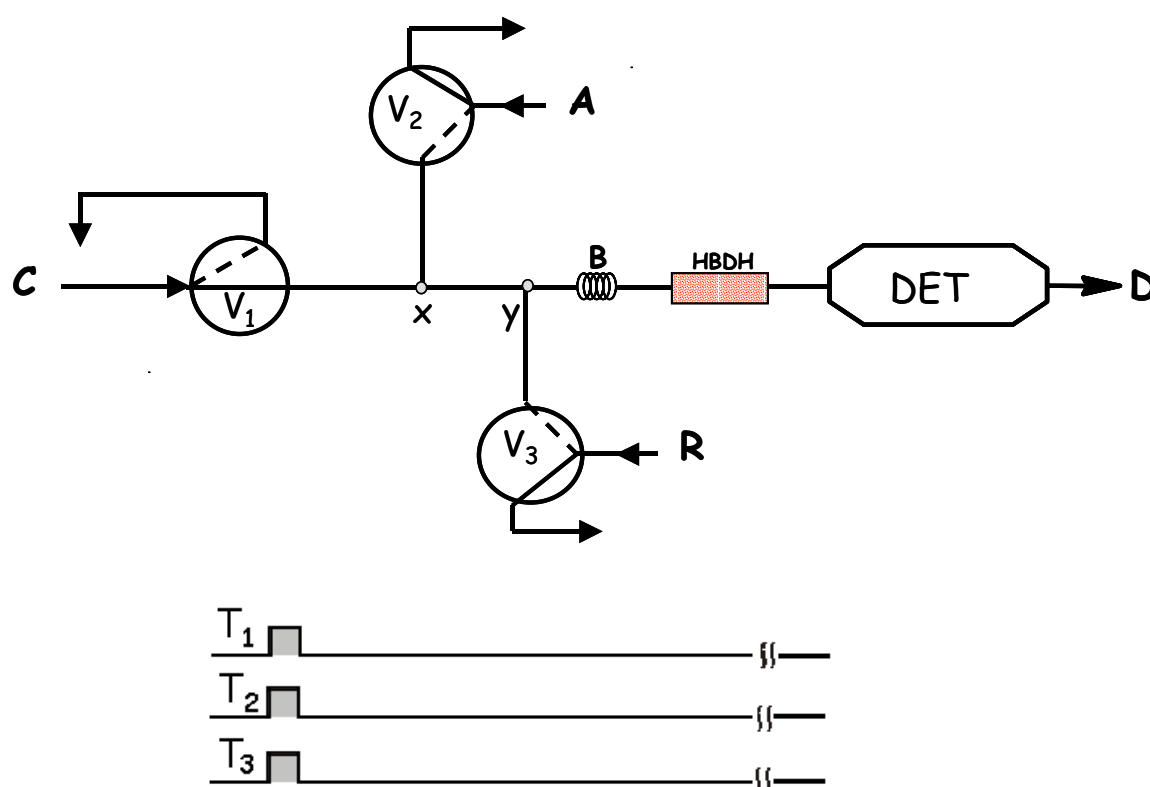


FIGURA 2.2 - Diagrama de fluxos do módulo de análises empregado para a determinação de 3-hidroxi-butarato em soro sanguíneo. V_1 , V_2 e V_3 - válvulas solenóides de três vias, A - amostra (vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$), C - carregador, tampão fosfato pH 7,0 (vazão de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$), R - reagente NAD^+ , $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (vazão de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$), x, y - pontos de confluência, HBDH - coluna enzimática, B - reator tubular helicoidal ($0,8 \text{ mm d.i.}$, 30 cm), DET - detector espectrofotométrico ($\lambda=340 \text{ nm}$), D - descarte, linhas sólida e tracejada dentro das válvulas indicam o caminho de fluxo quando a válvula é ligada ou desligada, respectivamente. Setas indicam a direção do bombeamento. T_1, T_2 e T_3 - tempo de acionamento das válvulas V_1, V_2 e V_3 , a superfície sombreada no diagrama de tempo de acionamento das válvulas indicam o momento em que as válvulas estão ligadas.

Com o sistema da Figura 2.2, alguns experimentos foram conduzidos inicialmente no sentido de se estabelecer as melhores condições para a reação enzimática. Foram estudados parâmetros como volume da solução da amostra a ser inserido no percurso analítico, vazão de bombeamento da solução transportadora e

solução de reagente, concentração do reagente NAD^+ , influência da concentração hidrogeniônica, influência de temperatura e estabilidade da coluna enzimática. Esses principais parâmetros envolvidos na reação enzimática foram estudados, inicialmente, a temperatura do ambiente ($21\text{ }^\circ\text{C}$), usando uma solução de referência contendo 75 mg L^{-1} de 3-hidroxiacetato.

2.3.5.3 - Influência do volume da solução da amostra

No sistema proposto apresentado na Figura 2.2, a reação de 3-hidroxiacetato com a enzima 3-hidroxiacetato desidrogenase ocorre enquanto a solução da amostra (A), após ter recebido o reagente NAD^+ (R), passa através da coluna enzimática (HBDH). Desta forma, a quantidade de 3-hidroxiacetato oxidado depende do tempo de residência da solução da amostra na coluna enzimática. Considerando isso, estudos foram conduzidos variando-se o tempo de acionamento da válvula V_2 em 1, 4, 7, 10, 13, 16 e 19 s, correspondendo ao volume da solução da amostra em 20, 80, 140, 200, 260, 320 e 380 μL , respectivamente.

2.3.5.4 - Influência da vazão de bombeamento das soluções

A influência da vazão da solução transportadora e do reagente NAD^+ foi avaliada variando-se as vazões de bombeamento em 1,4; 2,1; 2,6 e 3,2 mL min^{-1} e 0,7; 0,9; 1,2 e 1,4 mL min^{-1} , respectivamente, fixando-se a vazão de bombeamento da solução da amostra em 1,2 mL min^{-1} .

2.3.5.5 - Influência do comprimento do reator tubular helicoidal

Para a avaliação do comprimento do reator tubular helicoidal, foram fixadas as vazões da solução transportadora, amostra e reagente em 1,4; 1,2 e 1,4 mL min^{-1} , respectivamente. O comprimento do reator tubular helicoidal foi variado em 15, 30, 50 e 75 cm.

2.3.5.6 - Influência da concentração do reagente NAD^+

A coenzima NAD^+ oxida o 3-hidroxiacetato, na presença da enzima HBDH, formando o produto acetoacetato e NADH. Devido a essa influência na reação enzimática, avaliou-se a concentração do reagente NAD^+ entre 4 e 8 mmol L^{-1} .

2.3.5.7 - Influência da concentração hidrogeniônica

A concentração hidrogeniônica influencia fortemente o desenvolvimento das reações enzimáticas, existindo um pH ótimo para cada enzima, onde obtém-se atividade máxima. A influência da concentração hidrogeniônica na atividade enzimática foi avaliada variando-se o pH da solução do reagente entre 7,5 e 11,0, que consistia de 0,1 mol L^{-1} de glicina, 0,1 mol L^{-1} de NaCl e 0,1 mol L^{-1} de NaOH.

2.3.5.8 - Influência da temperatura

A atividade enzimática aumenta com a elevação da temperatura até atingir uma velocidade máxima, a partir da qual começa a decrescer. Assim, a influência da temperatura sobre a reação enzimática foi avaliada mantendo a coluna, contendo a enzima HBDH imobilizada em esferas de vidro, imersa em um banho com temperatura controlada. A temperatura do banho foi variada entre 19 e 50 °C.

2.3.5.9 - Determinação de 3-hidroxiacetato em amostras de soro sanguíneo

Após a otimização das condições citadas acima e estabelecidas as melhores condições de análise, realizou-se a determinação de 3-hidroxiacetato em amostras de soro sanguíneo empregando-se o sistema apresentado na Figura 2.2. Com esse sistema, procedeu-se a análise de 15 amostras de soro sanguíneo animal coletadas de ovinos e bovinos. As amostras foram inseridas em triplicata, e a cada 5

amostras analisadas, solução de referência contendo 75 mg L^{-1} de 3-hidroxiacetato era inserida no sistema.

Os resultados obtidos com o emprego do sistema automatizado foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o procedimento manual de análises (*kit*).

2.3.5.10 - Avaliação da estabilidade da coluna enzimática

Para avaliar a estabilidade da enzima, preparou-se uma coluna contendo a enzima HBDH imobilizada em esferas de vidro e iniciou-se as leituras registrando os sinais obtidos usando periodicamente solução de referência contendo 75 mg L^{-1} de 3-hidroxiacetato.

2.3.6 - Procedimento manual

Para a comparação de resultados, as amostras foram analisadas empregando-se o *Kit* comercial SIGMA Diagnostics (1994) para a determinação de 3-hidroxiacetato. O 3-hidroxiacetato foi determinado envolvendo a reação enzimática com a enzima HBDH e o preparo das soluções foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, conforme descrito a seguir.

O 3-hidroxiacetato desidrogenase (HBDH) catalisa a oxidação de 3-hidroxiacetato a acetoacetato. Durante essa oxidação, uma quantidade equimolar de dinucleotídeo adenina nicotinamida (NAD^+) é reduzida a NADH, sendo monitorada a 340 nm. A quantidade de NADH produzida é diretamente proporcional à concentração 3-hidroxiacetato na solução de amostra.

Desta forma, utilizando-se micro-pipetas, transferiram-se 3 mL da solução reagente de 3-hidroxiacetato contendo NAD^+ $4,6 \text{ mmol L}^{-1}$, ácido oxâmico e tampão pH 7,6 em três tubos de ensaio denominados de branco, de padrão e de amostra. Posteriormente, os tubos de ensaio foram colocados em um banho com temperatura controlada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. Em seguida, aos respectivos tubos de ensaio (branco, padrão e amostra), adicionaram-se $50 \text{ }\mu\text{L}$ de água deionizada, $50 \text{ }\mu\text{L}$ de solução padrão de 3-hidroxiacetato e $50 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de amostra, agitando-se

por inversão. Assim, realizaram-se as medidas de absorvância a 340 nm (Abs inicial), empregando-se um espectrofotômetro de absorção molecular UV/Vis equipado com cubeta de quartzo com volume interno de 4 mL. Após essa etapa, adicionaram-se, em cada tubo de ensaio, 50 μL de solução de HBDH (50 U mL^{-1}) e, em seguida, os tubos foram mantidos em um banho com temperatura controlada a 37 °C por 15 min. As amostras foram novamente analisadas espectrofotometricamente a 340 nm (Abs final). Para a determinação da concentração de 3-hidroxiacetato (mg dL^{-1}) nas amostras, realizadas em duplicata, empregou-se o procedimento de cálculo recomendado no manual de instruções do *kit*, ou seja,

$$\text{3-hidroxiacetato (mg dL}^{-1}\text{)} = 50 \times \frac{(\Delta\text{Abs amostra} - \Delta\text{Abs do branco})}{(\Delta\text{Abs padrão} - \Delta\text{Abs do branco})}$$

onde:

$\Delta\text{Abs amostra} = \text{leitura (Abs final}_{\text{amostra}} - \text{Abs inicial}_{\text{amostra}})$;

$\Delta\text{Abs branco} = \text{leitura (Abs final}_{\text{branco}} - \text{Abs inicial}_{\text{branco}})$;

$\Delta\text{Abs padrão} = \text{leitura (Abs final}_{\text{padrão}} - \text{Abs inicial}_{\text{padrão}})$.

2.4 - Resultados e discussão

O sistema automatizado em fluxo para a determinação de 3-hidroxiacetato em soro sanguíneo animal foi projetado baseando-se no conceito de multicomutação, com o propósito de potencializar sua aplicação em análises de rotina. Inicialmente, com o sistema mostrado na Figura 2.2, os principais parâmetros envolvidos foram estudados a temperatura do ambiente, ou seja, 21 °C, usando solução de referência contendo 75 mg L^{-1} de 3-hidroxiacetato.

Conforme descrito anteriormente (seção 2.2.2), os valores de referência para 3-hidroxiacetato em soro sanguíneo animal situam-se entre 35 e 139 mg L^{-1} , JOINT FAO/IAEA PROGRAMME (1993b). Desse modo, a faixa de concentração da curva analítica foi definida entre 10 e 150 mg L^{-1} de 3-hidroxiacetato. Os estudos foram conduzidos no sentido de que o sistema proposto apresentasse uma configuração simples e de fácil montagem, e rapidez na emissão de resultados.

O intervalo de tempo de acionamento da válvula V_2 define o volume da solução da amostra inserido no percurso analítico. Assim, a influência do volume da amostra foi avaliada inserindo-se uma solução de 3-hidroxi-butirato contendo 75 mg L^{-1} , variando-se o tempo de acionamento da válvula V_2 em 1, 4, 7, 10, 13, 16 e 19 s, correspondendo ao volume da solução da amostra em 20, 80, 140, 200, 260, 320 e $380 \mu\text{L}$, respectivamente. Isso era realizado selecionando-se, via teclado do computador, o tempo de acionamento da válvula V_2 . Inicialmente, nesse estudo, as vazões das soluções transportadora e do reagente foram fixadas em $1,4 \text{ mL min}^{-1}$, e o dimensionamento do reator tubular helicoidal em 30 cm (0,8 mm d. i.). Quando intervalos de tempo menores que 10 s eram selecionados para inserção das soluções, os resultados obtidos não eram reproduzíveis. Provavelmente, o tempo de residência da solução da amostra no interior da coluna enzimática não foi suficiente para que ocorresse a reação. Observou-se um bom compromisso entre magnitude de sinal e precisão das medidas quando se empregou intervalo de tempo de 10 s. É importante ressaltar que não foram observadas melhorias em termos de sensibilidade e linearidade quando os intervalos de tempo foram maiores que 10 s. No entanto, esses aumentos no intervalo de tempo, para a inserção do volume da solução da amostra, produziam um aumento no tempo de residência da amostra através do sistema, diminuindo a frequência analítica e dificultando a etapa de limpeza. De acordo com esses resultados, para a inserção do volume da solução da amostra, foi mantido o intervalo de tempo de 10s ($200 \mu\text{L}$).

A influência da vazão da solução transportadora foi avaliada fixando-se a vazão de bombeamento da solução da amostra em $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e a vazão do reagente em $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, variando-se a vazão de bombeamento em 1,4; 2,1; 2,6 e $3,2 \text{ mL min}^{-1}$. Desses resultados, pôde-se constatar diminuição significativa na magnitude dos sinais à medida que aumentou a vazão de bombeamento da solução transportadora. A vazão de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$ foi escolhida, tendo em vista que a sensibilidade era satisfatória para a finalidade desejada, e que vazões maiores acentuavam a diluição. De maneira análoga, estudos foram conduzidos variando-se em 0,7; 0,9; 1,2 e $1,4 \text{ mL min}^{-1}$ a vazão de bombeamento da solução do reagente NAD^+ . Verificou-se uma diminuição de aproximadamente 40% no sinal analítico à medida que a vazão de bombeamento diminuía de 1,4 para $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. Contudo, a curva analítica assumia um perfil assintótico, indicando falta de reagente. A vazão

de bombeamento foi fixada em $1,4 \text{ mL min}^{-1}$, pois apresentou melhores resultados em termos de linearidade e sensibilidade.

A dimensão do reator tubular helicoidal foi avaliada variando-se o comprimento em 15, 30, 50 e 75 cm. Nesse estudo, observou-se diminuição do sinal analítico obtido quando se empregou comprimentos de 15, 50 e 75 cm comparados ao comprimento do reator de 30 cm. No caso do estudo realizado com o reator de comprimento de 15 cm, o tempo para a mistura entre a amostra e reagente não era suficiente para desenvolvimento da reação. Para os reatores de 50 e 75 cm, a diminuição no sinal analítico deve-se, provavelmente, ao processo de dispersão. Para os estudos que se seguiram, o comprimento do reator tubular helicoidal foi fixado em 30 cm.

A concentração do reagente NAD^+ foi estudada na faixa entre 4 e 8 mmol L^{-1} e os resultados estão mostrados na Figura 2.3. Como pode ser observado, à medida que aumentou a concentração do reagente NAD^+ , até a concentração de 7 mmol L^{-1} , a magnitude do sinal também aumentou. A solução contendo 7 mmol L^{-1} de dinucleotídeo adenina nicotinamida (NAD^+) foi a que apresentou melhores resultados, com o máximo do sinal analítico, e foi fixada para continuidade do desenvolvimento deste procedimento.

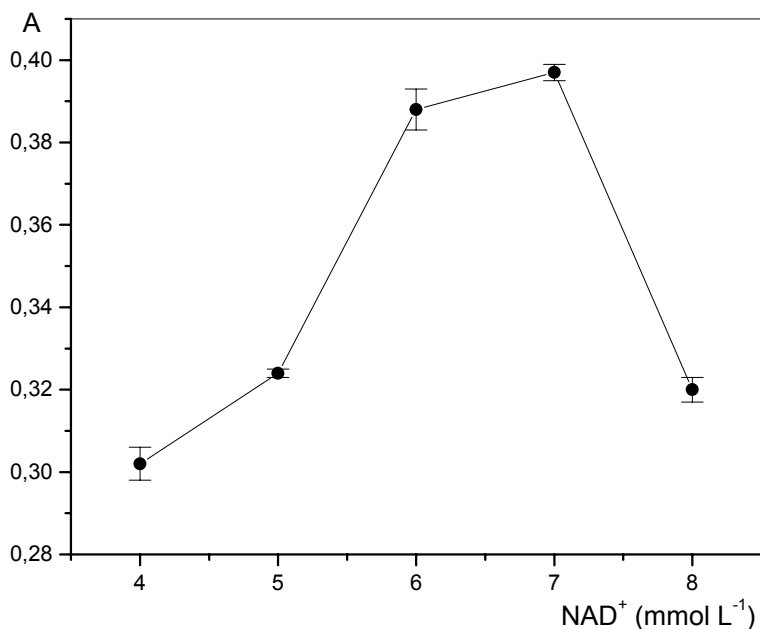


FIGURA 2.3 - Influência da concentração do reagente NAD^+ , $n=3$. Resultados obtidos empregando-se o sistema da Figura 2.2.

A influência da concentração hidrogeniônica na atividade enzimática foi avaliada pela mudança de pH da solução do reagente NAD^+ na faixa entre 7,5 e 11,0 usando tampão glicina. Pode-se observar pela Figura 2.4 que a magnitude do sinal aumenta gradativamente à medida que aumenta o pH, até a unidade de 9,3. Acima dessa unidade, a magnitude do sinal diminui gradativamente. Considerando-se esses resultados, fixou-se o pH da solução do reagente NAD^+ em tampão glicina em 9,3.

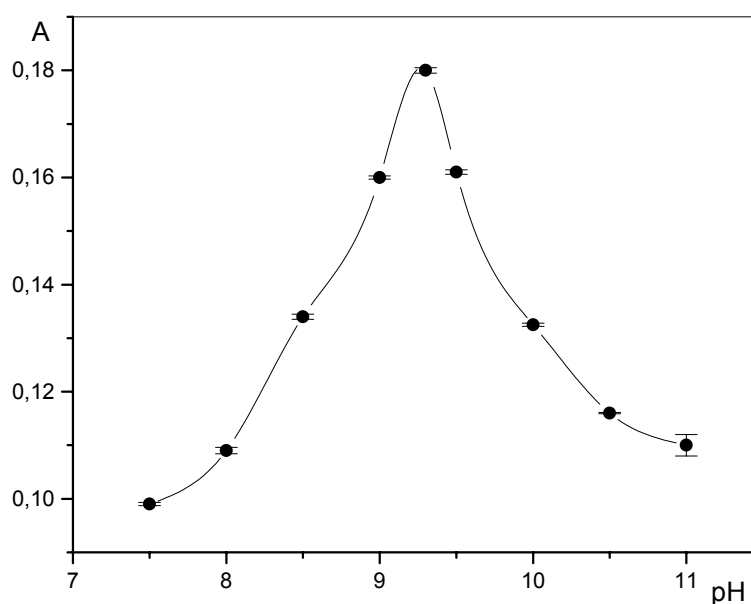


FIGURA 2.4 - Influência da concentração hidrogeniônica sobre a reação enzimática, $n=3$. Estudo realizado com o sistema da Figura 2.2.

Após esses estudos, também observou-se a influência de variações da temperatura na reação enzimática. Isso foi avaliado mantendo-se a coluna enzimática, contendo a enzima HBDH imobilizada em esferas de vidro, imersa em um banho com temperatura controlada. Variou-se a temperatura do banho entre 19 e 50 °C. É importante salientar que o banho deve estar com a temperatura estabilizada, antes de se iniciar as análises. Os resultados obtidos nesse estudo são apresentados na Figura 2.5. Pode-se observar que para valores acima da temperatura ambiente (21 °C) houve uma diminuição da magnitude de sinal. Quando a temperatura do banho atingiu 50 °C, observou-se uma diminuição do sinal analítico

de aproximadamente 30%. Evitaram-se temperaturas mais elevadas a fim de não favorecer a liberação de gás e formação de bolhas, indesejáveis em sistemas de fluxo. Desde que a reação enzimática é dependente da temperatura, esta foi fixada em 21 °C (temperatura do ambiente), o que resultou em melhor desenvolvimento da reação e maior sensibilidade. Como consequência desse estudo, foi possível eliminar do sistema o banho com temperatura controlada.

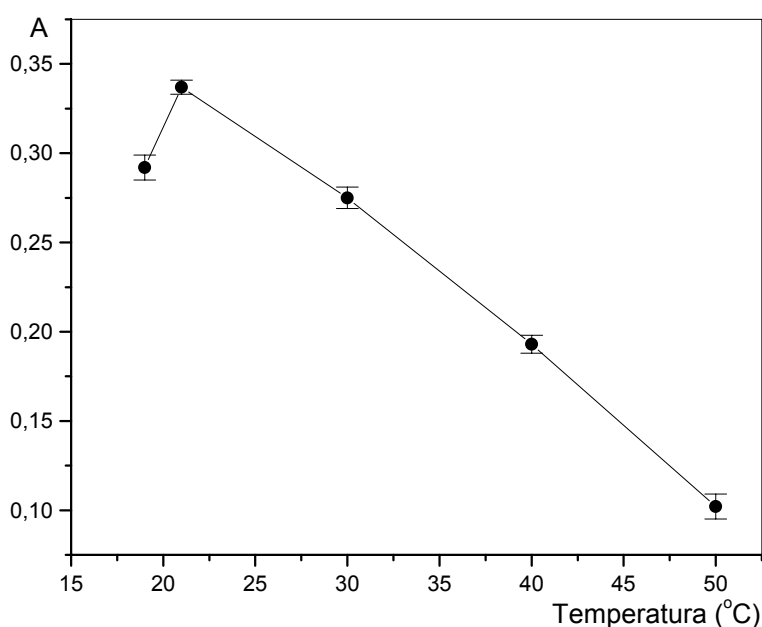


FIGURA 2.5 - Influência de variações na temperatura sobre a reação enzimática, n=3. Resultados obtidos empregando-se o sistema da Figura 2.2.

Considerando a complexidade da amostra de soro sanguíneo animal, estudos foram realizados empregando-se o método da adição-padrão e calculando-se os valores de recuperação. Quantidades conhecidas de 3-hidroxi-butirato contendo 10 mg L^{-1} , 30 mg L^{-1} e 75 mg L^{-1} foram adicionadas à amostra desconhecida de soro sanguíneo animal, e com o aumento do sinal estimou-se quanto de constituinte estava na amostra original. Uma vez realizado esse estudo, as recuperações calculadas situaram-se entre 96 e 104%, comprovando-se que não houve efeito de matriz.

Uma vez definidas as melhores condições para a análise, a construção da curva analítica de 3-hidroxi-butirato foi obtida mantendo-se fixos os seguintes

parâmetros: solução transportadora de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato pH 7,0, solução $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de reagente NAD^+ , comprimento do reator tubular helicoidal de 30 cm e temperatura da reação enzimática de $21 \text{ }^\circ\text{C}$.

O registro dos sinais transientes, obtidos com soluções de referências entre 10 e 150 mg L^{-1} de 3-hidroxiacetato, é mostrado na Figura 2.6. Pode-se observar a boa estabilidade e repetibilidade obtidas, comprovadas também no decorrer de um período de trabalho de 8 h, quando não foram observadas variações significativas nos sinais da curva analítica.

Outros aspectos favoráveis observados foram frequência analítica de 60 determinações por hora, baixo consumo de reagente NAD^+ ($0,9 \text{ mg}$) e de enzima HBDH ($8 \text{ } \mu\text{g}$), e volume de $200 \text{ } \mu\text{L}$ de amostra por determinação de 3-hidroxiacetato. O limite de detecção foi calculado considerando três vezes o desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente angular, segundo MILLER e MILLER (1988), obtendo-se 2 mg L^{-1} , em nível de confiança de 99,7%. O desvio padrão relativo, estimado para uma amostra de soro animal contendo 75 mg L^{-1} de 3-hidroxiacetato foi de 1,4% ($n=17$).

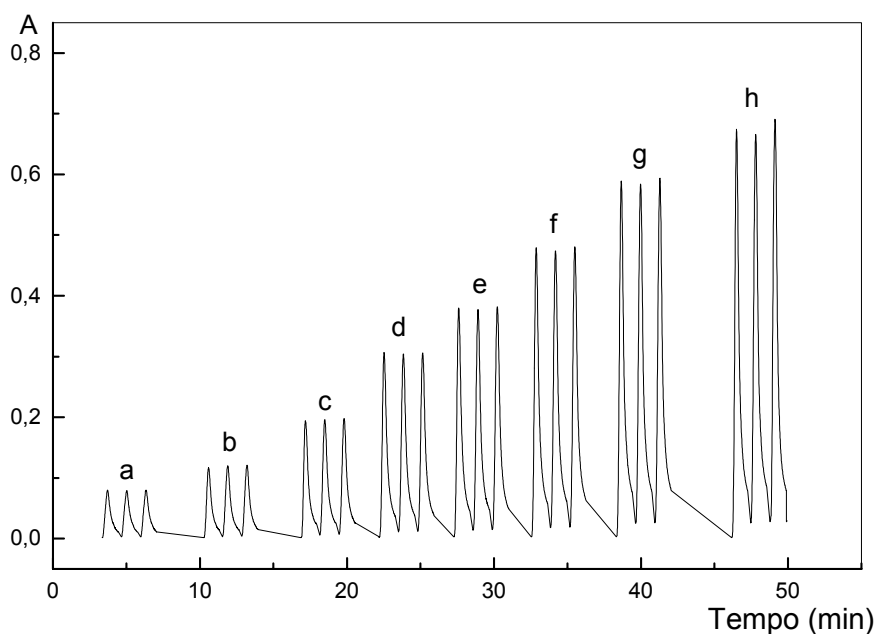


FIGURA 2.6 - Registro de rotina referente à determinação de 3-hidroxiacetato em soro sanguíneo animal. Da esquerda para a direita os sinais identificados pelas letras a, b, c, d, e, f, g e h correspondem, respectivamente, às soluções de referência contendo $0, 10, 25, 50, 75, 100, 125$ e 150 mg L^{-1} de 3-hidroxiacetato.

De acordo com a configuração do sistema de fluxos para a determinação de 3-hidroxiacetato em soro sanguíneo animal, apresentado na Figura 2.2, o intervalo de tempo disponível para o desenvolvimento da reação foi de 10 s. Nessa condição, obteve-se resposta linear para a faixa de concentração entre 10 e 150 mg L⁻¹ de 3-hidroxiacetato ($y = 0,092 + 0,004 x$, sendo y = absorbância e x = concentração), conforme Figura 2.7.

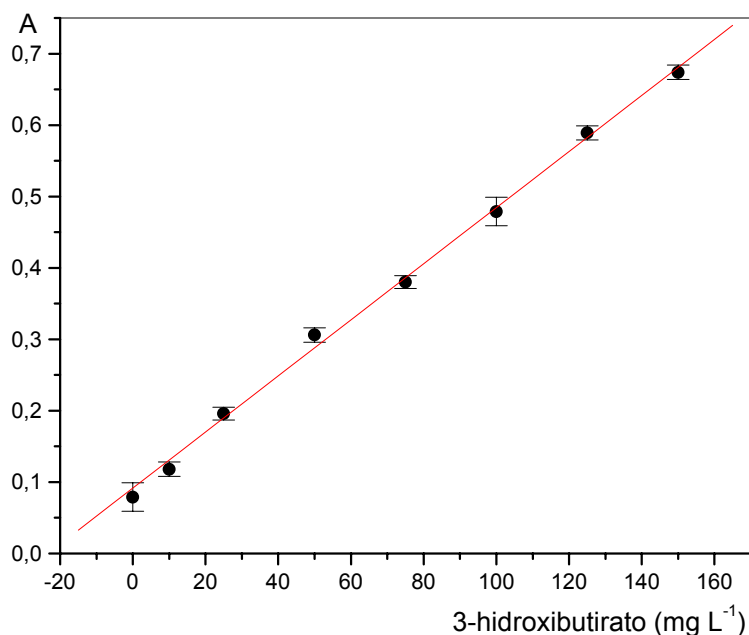


FIGURA 2.7 - Curva analítica obtida para 3-hidroxiacetato. Condições: solução 0,1 mol L⁻¹ tampão fosfato pH 7,0, solução 7,0 mmol L⁻¹ de NAD⁺, reator tubular helicoidal de 30 cm e temperatura de 21 °C ($y = 0,092 + 0,004 x$, $r = 0,998$).

Um conjunto de quinze amostras de soro de sangue de ovinos e bovinos foi analisado, sem tratamento prévio, pelo procedimento proposto e os resultados obtidos comparados com aqueles obtidos com o procedimento manual de análise SIGMA Diagnostics (1994). As amostras foram inseridas em triplicata e, após 5 amostras analisadas, solução de referência contendo 75 mg L⁻¹ de 3-hidroxiacetato era inserida no sistema.

Os resultados estão apresentados na Tabela 2.1. A análise estatística dos resultados, empregando-se o teste *t*, demonstrou que não há diferença significativa entre os resultados em nível de 95% de confiança, HARRIS (1995).

TABELA 2.1 - Resultados obtidos na determinação de 3-hidroxiacetato em amostras^a de soro ovino e bovino empregando o sistema proposto e o procedimento manual.

Amostra	Sistema proposto (mg L ⁻¹)	Procedimento manual (mg L ⁻¹)
ovino	20 ± 1	18 ± 1
ovino	24 ± 1	23 ± 2
ovino	19 ± 1	20 ± 3
ovino	23 ± 1	22 ± 1
ovino	19 ± 1	20 ± 2
ovino	21 ± 2	19 ± 2
ovino	25 ± 1	24 ± 2
ovino	37 ± 1	35 ± 1
bovino	64 ± 2	66 ± 1
bovino	58 ± 2	56 ± 3
bovino	68 ± 1	69 ± 1
bovino	75 ± 1	76 ± 1
bovino	72 ± 1	73 ± 1
bovino	70 ± 2	67 ± 1
bovino	70 ± 1	68 ± 1

^a Resultados representam médias e desvio padrão estimados a partir de 3 replicatas

Adicionalmente, realizou-se uma avaliação da estabilidade da coluna enzimática. Nesse caso, preparou-se uma coluna contendo a enzima HBDH imobilizada em esferas de vidro e registraram-se os sinais obtidos para solução de referência contendo 75 mg L⁻¹ de 3-hidroxiacetato em intervalos de 2 h.

Trabalhando-se continuamente, 600 determinações puderam ser feitas com um decréscimo de 5% na magnitude dos sinais. Para o armazenamento da coluna, após as análises ou entre períodos de uso, alguns cuidados foram tomados. A coluna foi preenchida com solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato pH 7,0, as extremidades foram fechadas para evitar o deslocamento da solução e foi mantida sob refrigeração a 5 °C. Observou-se durante os experimentos que a eficiência de conversão aumentava quando a coluna enzimática HBDH era deixada em repouso por algumas horas, ou de um dia para o outro, em solução tampão fosfato pH 7,0. Cabe salientar que, nesse caso, a eficiência de conversão estava relacionada ao aumento da magnitude do sinal referente a solução de 75 mg L⁻¹ de 3-hidroxibutirato.

Alguns dados obtidos, para fins de comparação, para ambos os procedimentos, em fluxo e manual, estão apresentados na Tabela 2.2. Com o sistema proposto obteve-se uma redução de volume de solução de reagente e, conseqüentemente, de efluente gerado. Outra vantagem foi a freqüência de amostragem, 60 determinações por hora e cerca de 15 determinações por hora para o procedimento manual (dependendo da agilidade do analista). Considerando-se a manipulação das amostras, esta foi maior para o procedimento manual, podendo assim, inferir contaminações. Aliado a isso, para o procedimento em fluxo, o custo foi reduzido por determinação de amostra. Esta estimativa foi calculada considerando-se os preços das soluções usadas para as determinações, excluindo-se os preços de equipamentos e mão-de-obra do analista por hora trabalhada.

TABELA 2.2 - Comparação entre o procedimento proposto e o procedimento manual.

Parâmetros	Procedimentos	
	Proposto	Manual
Volume de amostra	200 µL	50 µL
Consumo de reagentes	235 µL	9000 µL
Efluente gerado	1600 µL	9150 µL
Freqüência de amostragem	60 det./h	?
Manuseio da amostra	<	>
Custo por determinação	R\$ 1,06	R\$ 124,00

2.5 - Conclusões

O método automatizado proposto é perfeitamente aplicável às determinações em amostras de soro sanguíneo animal, apresentando boa sensibilidade, precisão e velocidade analítica. O sistema tem como vantagens baixo custo, maior facilidade operacional, menor efluente gerado e redução no manuseio da amostra, evitando possíveis contaminações. Essas vantagens tornam o procedimento atrativo para aplicações em larga escala.

Considerando o procedimento proposto foi obtida uma economia de enzima (1 U por determinação), em contraste com o procedimento manual (5 U por determinação). O consumo do reagente NAD^+ foi reduzido e os resultados para cada determinação foram obtidos em menor espaço de tempo.

A coluna contendo a enzima apresentou boa estabilidade, caracterizada por 600 determinações, o qual é satisfatório para o método proposto.

A frequência de amostragem, 60 determinações por hora, foi duas vezes maior e o consumo de enzima menor quando comparado com outros procedimentos propostos também empregando análises em fluxo, KIBA et al. (1994a), KIBA et al. (1995), KIBA et al. (1997).

CAPÍTULO 3. SISTEMA DE ANÁLISES EM FLUXO EMPREGANDO MULTICOMUTAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE GLICOSE EM SORO DE SANGUE ANIMAL USANDO REAÇÃO ENZIMÁTICA E DETECÇÃO QUIMILUMINESCENTE

3.1 - Introdução

A maioria dos transtornos metabólicos em animais pode ser detectada mediante o uso de perfis bioquímicos do sangue nas épocas em que os animais estão mais susceptíveis, como por exemplo, no pós-parto. O termo perfil metabólico se refere ao estudo de alguns componentes hemato-químicos específicos que servem para avaliar, diagnosticar e prevenir transtornos metabólicos, PAYNE et al. (1970).

A concentração sanguínea de um determinado metabólico é indicador do volume de reservas de disponibilidade imediata. Essa concentração é mantida dentro de certos limites de variações fisiológicas, consideradas como valores de referências. Embora as análises sanguíneas possam ter menos especificidade, servem como um sinal de alerta diante do problema para que, em casos de alterações, possam ser realizados os diagnósticos pertinentes e, assim, corrigir oportunamente a situação, WITTWER (1995).

Dentre os componentes bioquímicos sanguíneos mais comumente determinados no perfil metabólico está a glicose, representando o metabolismo energético, WITTWER e CONTRERAS (1980).

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um procedimento em fluxo empregando multicomutação para a determinação de glicose em soro sanguíneo animal. O sistema foi desenvolvido utilizando detecção quimiluminescente e reação enzimática, visando obter características analíticas vantajosas, especialmente no que se refere à sensibilidade e seletividade analítica, bem como instrumentação simples e versátil. Desta forma, almeja-se diminuir a manipulação de amostra, reduzir o consumo de reagentes e, conseqüentemente, o volume de efluente gerado e obter rapidez na emissão de resultados.

3.2 - Revisão de literatura

3.2.1 - Aspectos gerais

As exigências produtivas impostas pela seleção genética e os sistemas de manejo intensivo têm aumentado o risco de desbalanços nutricionais e de doenças metabólicas no rebanho, CONTRERAS et al. (2000), situação que PAYNE e PAYNE (1987) denominam “Doenças da Produção”.

Enquanto ferramenta laboratorial, o perfil metabólico será útil se considerado junto com o exame clínico e o histórico do rebanho como um todo, ou dos animais individualmente, GONZÁLEZ (2000).

Dos exames de fluidos, o sangue é o mais utilizado, especialmente desde 1970, quando Payne e colaboradores em Compton (Inglaterra) propuseram o uso dos perfis metabólicos. Este teste mede a concentração sanguínea dos metabólitos que representam as distintas vias metabólicas, em grupos de animais do rebanho, CONTRERAS et al. (2000).

O resultado de um exame laboratorial confiável e de qualidade depende do preparo do animal, da coleta do material e do manuseio da amostra. Qualquer variação nos procedimentos pode comprometer o resultado do exame.

Amostras coletadas após o animal ter se alimentado pode apresentar-se lipêmica (presença de gordura no sangue). A lipemia pode causar hemólise, concentração alta de glicose e dos lipídeos e aumento de bilirrubinas. Algumas drogas como, por exemplo, a cefalosporina provoca alteração de creatinina, as tetraciclina interferem na determinação da glicose. O ácido ascórbico endógeno e exógeno pode influenciar os testes de glicose negativamente. A insulina exógena diminui as concentrações séricas de glicose, fosfato e potássio, ANCLIVEPA /SP (2003).

Entre os metabólitos mais usados para avaliar o status energético está a glicose. A Figura 3.1 apresenta a fórmula estrutural da molécula de glicose.

Propionato e aminoácidos são os principais precursores de glicose nos ruminantes, embora lactato e glicerol também sejam utilizados, SILVA e LEÃO (1979). O consumo reduzido de alimento no início de lactação fornece quantidades

insuficientes de aminoácidos e de propionato que devem atender, primariamente, as exigências de glicose da glândula mamária.

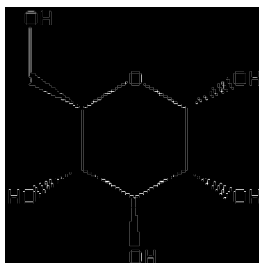


FIGURA 3.1 - Fórmula estrutural da molécula de glicose.

A insulina, hormônio sintetizado pelo pâncreas, estimula a captação da glicose pelas células ou estimula o armazenamento, na forma de glicogênio, nas células hepáticas e musculares. Nesse momento, os níveis de glicose caem no sangue (hipoglicemia). Com a ação da insulina há o estímulo, também no pâncreas, de produção do hormônio glucagon que possui ação oposta à insulina, ou seja, eleva o nível da glicose no sangue, CARBOIDRATOS/METABOLISMO (2003).

3.2.2 - Significado clínico da concentração de glicose em soro animal

As variações climáticas, o estresse do animal, mudanças de dietas, lactação, insulina e vários hormônios são fatores que alteram a concentração da glicose.

Lesões encefálicas no animal podem ser acompanhadas de hiperglicemia. A hipoglicemia ocorre em vacas de alta produção, devido às altas exigências energéticas. Nas ovelhas e cabras este quadro é conhecido como toxemia da prenhez, pois ocorre no último terço da gestação, principalmente, naqueles animais com mais de um feto, pois as necessidades de glicose também são maiores. A hipoglicemia pode ocorrer também em animais que não apresentam tanta exigência de glicose, mas que se encontram subnutridos ou altamente parasitados. Os animais afetados apresentam gradual queda no apetite e diminuição

na produção de leite. Em fases mais avançadas apresentam tumores musculares, convulsões, distúrbios visuais, ranger de dentes, coma e morte. O tratamento usualmente é ineficaz, sobretudo nos casos em que a hipoglicemia tenha provocado grave lesão encefálica. Recomenda-se terapia oral com substratos gliconeogênicos, GUIA ONLINE DE CLÍNICA BUIÁTRICA (2003).

Contudo, a determinação de glicose é um indicador plasmático de metabolismo energético, sendo importante a sua análise em amostras de sangue para a nutrição animal.

3.2.3 - Métodos analíticos para a determinação de glicose

GORTON e BHATTI (1979) desenvolveram um sistema em fluxo com detecção potenciométrica para a determinação de glicose em fluidos biológicos, baseado na oxidação da glicose na presença de 1,4-benzoquinona, pela enzima glicose oxidase imobilizada, produzindo ácido glucónico e hidroxiquinona. Uma unidade de diálise foi introduzida no sistema para a remoção de proteínas. Um eletrodo de ouro foi posicionado antes do reator enzimático para monitorar a 1,4-benzoquinona e outro eletrodo posicionado após o reator enzimático, para monitorar a hidroquinona produzida. A quantidade de glicose nas amostras foi determinada pela relação entre 1,4-benzoquinona e hidroquinona. O sistema proposto apresentou linearidade na faixa entre $0,04 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glicose.

Um sistema por injeção em fluxo para a determinação de glicose e uréia em amostras de soro e urina, respectivamente, foi desenvolvido por GORTON e OGREN (1981). A determinação de glicose baseou-se na oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase imobilizada, produzindo peróxido de hidrogênio que foi complexado com 4-aminofenazona e N,N-dimetilanilina, formando um complexo colorido. O complexo formado foi catalisado pela enzima peroxidase e determinado espectrofotometricamente em 555 nm. A determinação da uréia baseou-se na conversão em amônia pela enzima urease e detectada por um eletrodo de membrana gasosa. Em ambos os sistemas utilizou-se uma unidade de diálise, para a remoção de proteínas e potenciais interferentes. O procedimento proposto apresentou uma resposta linear entre $1,6 \times 10^{-4}$ e $1,6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para glicose e,

10^{-4} e 10^{-1} mol L⁻¹ para uréia, utilizando-se 25 µL e 100 µL de volume de amostra, respectivamente.

HUANG et al. (1991) desenvolveram um sistema FIA para determinação *on-line* de glicose em cultura de célula animal. O sistema foi baseado na imobilização da glicose oxidase. O peróxido de hidrogênio produzido pela reação enzimática foi detectado por quimiluminescência, utilizando o reagente luminol. O procedimento proposto apresentou resposta linear na faixa entre 10^{-5} e 5×10^{-2} mol L⁻¹ de glicose, com desvio padrão relativo de 3% (n=5). O reator enzimático apresentou estabilidade de quatro semanas e frequência analítica de 20 determinações por hora. Os resultados obtidos pelo procedimento proposto foram concordantes com os resultados do procedimento *off-line*, Yellow Springs Instrument Company Model 27.

NAKASHIMA et al. (1991) propuseram um procedimento analítico em fluxo para a determinação de glicose e ácido úrico em amostras de soro e urina. O método baseou-se na detecção quimiluminescente do peróxido de hidrogênio com o oxalato de bis(2,4,6-triclorofenol) e o composto fluorescente, 2,4,6,8-tetratiomorfolinopirimido[5,4-d] pirimidino. O sistema apresentou limite de detecção de 5×10^{-7} mol L⁻¹ para glicose e ácido úrico e, desvio padrão relativo de 1,1% e 2,2% para glicose e ácido úrico, respectivamente. Os resultados foram comparados com procedimentos colorimétricos apresentando correlação linear de $r = 0,994$ para a glicose e de $r = 0,986$ para o ácido úrico.

Um eletrodo para a determinação de glicose em produto farmacêutico foi desenvolvido por MAGNA et al. (1993). O eletrodo para glicose foi construído imobilizando-se a glicose oxidase sobre uma membrana de acetato de celulose com glutaraldeído montada sobre um eletrodo de tungstênio-óxido de tungstênio. Os íons H₃O⁺ produzidos na reação enzimática foram detectados no eletrodo de tungstênio. O método proposto para a determinação de peróxido de hidrogênio apresentou características analíticas como linearidade entre $2,4 \times 10^{-4}$ e $1,66 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato pH 5,5, com coeficiente de correlação de 0,993 e coeficiente angular de 51,3 mV/década. O tempo de vida do eletrodo foi de 1 mês, sendo possível obter aproximadamente 1000 determinações, limite de detecção de 2×10^{-4} mol L⁻¹ e desvio padrão de 7,8%. Os resultados obtidos pelo procedimento potenciométrico foram concordantes com os resultados obtidos pelo procedimento espectrofotométrico em 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. (1996). 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 $4,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A curva analítica foi linear na faixa entre 5 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 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 $300 \mu\text{g mL}^{-1}$. 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 complicadas, como o soro. 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 *on-line* de glicose e penicilina, durante cultivo de filamentos de fungos, foi proposto por MIN et al. (1996). 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. A determinação de glicose foi baseada em reação enzimática utilizando-se a enzima glicose oxidase, com formação de peróxido de hidrogênio, e subsequente detecção de H_2O_2 pela reação quimiluminescente com o luminol. A determinação de penicilina foi baseada na formação de ácido penicilóico pela enzima penicilinase. O ácido penicilóico foi detectado por quimiluminescência e pelo método de 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 descolorimétrico, 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 para a determinação de glicose em amostras de sangue, utilizando FIA e sensor amperométrico, baseado na imobilização de glicose oxidase e hexacianoferrato em eletrodo de níquel modificado foi desenvolvido por

MILARDOVIC et al. (1997). A enzima glicose oxidase foi imobilizada na superfície de um eletrodo de níquel formando um filme eletrocristalizado de hexacianoferrato de níquel alcalino utilizando procedimento de ligações cruzadas com glutaraldeído e albumina de soro bovino. O eletrodo modificado oxidava a glicose em peróxido de hidrogênio pela seletividade biocatalítica da enzima. O eletrodo mostrou-se sensível a potenciais entre -300 e -100 mV vs Ag/AgCl com resposta linear entre $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2,9 \text{ mmol L}^{-1}$. A vida útil do eletrodo foi de aproximadamente 3 meses com decréscimo de 30% na sensibilidade.

QIN et al. (1998) 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). Utilizaram-se duas bombas peristáltica, 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 $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, limite de detecção de $1,2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, desvio padrão relativo inferior a 5% e frequência analítica de 50 determinações por hora. Para a determinação de glicose, os autores obtiveram uma linearidade entre $5,0 \times 10^{-7}$ e $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, limite de detecção de $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ com desvio padrão relativo de 4%. Nesse procedimento, observa-se um volume de efluente gerado de 7 mL por determinação.

CHEN et al. (1999) desenvolveram um método fluorescente para a determinação de glicose pelo junção da reação fluorescente de ácido p-hidroxifenilacético e H_2O_2 , e *hemin* como catalisador. A glicose pode produzir H_2O_2 em solução quando irradiada pela luz UV, mesmo na ausência da glicose oxidase. Baseado nesse efeito, os fótons foram utilizados como substrato para glicose oxidase. No procedimento proposto foi observado linearidade entre 0,1 e $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de glicose, limite de detecção de $1,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, desvio padrão relativo de 3,9% (n=6), para a determinação de $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de glicose.

Um sistema microfluidico acoplado a um biosensor quimiluminescente foi proposto por LV et al. (2003) para a determinação de glicose em soro humano. A glicose oxidase foi imobilizada em esferas de vidro pela ativação com glutaraldeído 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 25 x 45 x 5 mm. 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 analítica de 12 determinações por hora.

3.3 - Parte experimental

3.3.1 - Princípio do método

O método selecionado para a determinação de glicose em soro de sangue animal baseia-se na reação enzimática apresentada na Figura 3.2.

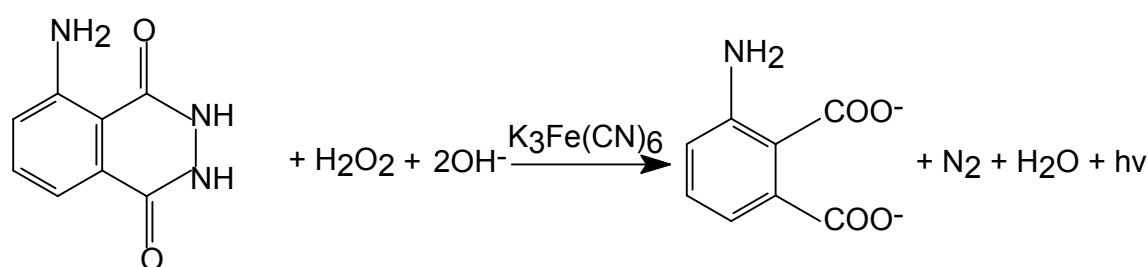


FIGURA 3.2 - Mecanismo de reação para a determinação de glicose em amostras de soro animal.

A glicose é oxidada pela enzima glicose oxidase a ácido glucónico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com o luminol em meio alcalino (pH 10,5), na presença do catalisador hexacianoferrato (III), produzindo uma luminescência azul em torno de 420 nm.

3.3.2 - Materiais

3.3.2.1 - Equipamentos e acessórios

O sistema consistiu de um espectrofotômetro Femto, modelo 700 Plus, equipado com uma cela para detecção quimiluminescente, constituída por dois blocos de acrílicos (80 mm² de superfície), entre os blocos foi posicionada uma borracha puncionétrica de 1,0 mm de espessura, apresentada na Figura 3.3. Utilizaram-se 4 válvulas solenóides de três vias Nresearch 161T031, tubos de polietileno com 0,8 mm de diâmetro interno empregados na confecção de linhas de transmissão, reator helicoidal e conectores em acrílico em forma de "T". As válvulas solenóides foram controladas por um microcomputador 586, equipado com interface de controle PCL-711S da American Advantech Corp.. Uma bomba peristáltica (Ismatec, IPC-8) com velocidade variável e equipada com tubos de bombeamento de Tygon[®] de diferentes diâmetros internos foi empregada para propulsão das soluções. Uma mini-coluna de 15 mm x 5 mm de diâmetro interno foi confeccionada em acrílico, para o acondicionamento das esferas de vidro contendo a enzima imobilizada. O programa utilizado para controle das válvulas solenóides e para a aquisição de dados foi desenvolvido em linguagem Quick BASIC 4.5.

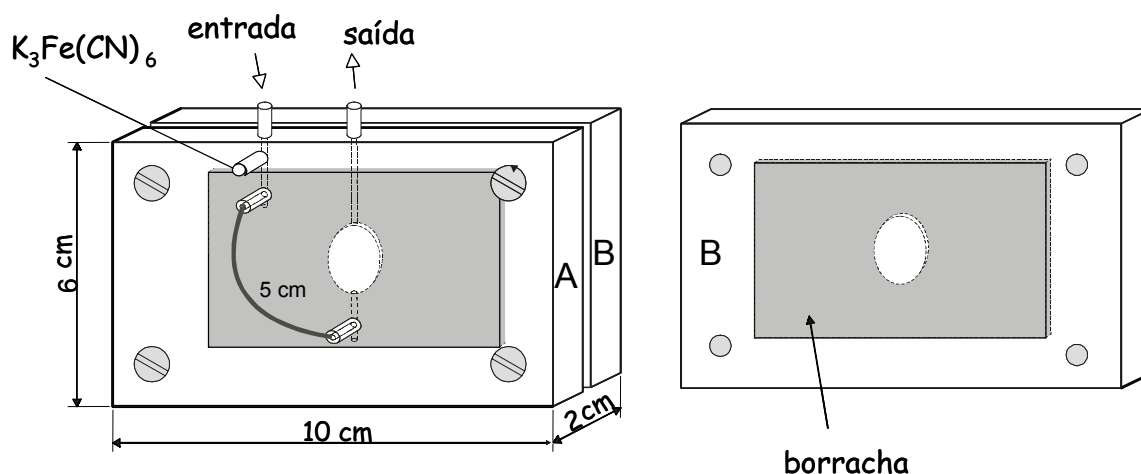


FIGURA 3.3 - Cela para detecção quimiluminescente, MARTELLI et al. (2001).

Equipamentos complementares utilizados: sistema a vácuo para coleta de sangue animal, centrífuga Centra - 7R (6000 rpm), pipetadores automáticos para micro-volumes, ponteiros de micropipetas para volumes entre 20 e 5000 μL , tubos de ensaio com volume interno de 10 mL, suporte para tubos de ensaio, cubeta de vidro com volume interno de 4 mL e banho com temperatura controlada FANEM[®], modelo 102.

3.3.2.2 - Reagentes e soluções

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

Solução estoque contendo $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de glicose foi preparada dissolvendo-se 2 g de glicose em água. Soluções de referência contendo 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg L^{-1} de glicose foram preparadas em água por diluições apropriadas da solução estoque. Essas soluções foram mantidas sob refrigeração a 5°C quando não estava em uso.

Solução de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de 5-amino-2,3-di-hidroftolazina-1,4-diona (luminol) foi preparada dissolvendo-se 0,0443 g de luminol em 100 mL de solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ K_2CO_3 com pH ajustado a 10,5 com solução de HCl. Essa solução era armazenada em frasco âmbar e mantida sob refrigeração, quando não estava em uso.

Solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão carbonato, pH 10,5, foi preparada dissolvendo-se 13,821 g de K_2CO_3 em água. O valor do pH foi ajustado com solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl e o volume completado para 500 mL.

Solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ foi preparada diariamente dissolvendo-se 3,293 g do sal em 100 mL de água.

Solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 6,0 e 7,5) foi preparada dissolvendo-se 13,6 g de KH_2PO_4 em água. Os valores de pH foram ajustados com solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH e o volume foi completado para 1000 mL.

Solução de enzima glicose oxidase, *Aspergillus Niger* (G-7016, Sigma), foi preparada em 20 mL de tampão fosfato (pH 7,5) contendo 4,2 mg (150 U).

Solução de cianoborohidreto de sódio foi preparada dissolvendo-se 0,002 g desse reagente em 10 mL de água.

Solução 0,1 mol L⁻¹ de glicina foi preparada dissolvendo-se 0,75 g de glicina em 100 mL de água.

Solução 200 U enzima peroxidase, *Horseradish* (Sigma), foi preparada dissolvendo-se 1,0 mg em 5 mL de tampão fosfato pH 7,5.

Os reagentes cromogênicos foram preparados dissolvendo-se 17 mg de fenol em 25 ml de tampão tris(hidroximetil)aminometano pH 6,5 e 4 mg de 4-aminoantipirina em 50 mL da mesma solução tampão. Antes do uso, as soluções foram misturadas. Solução 150 mmol L⁻¹ de tampão tris(hidroximetil)aminometano foi preparada dissolvendo-se 4,54 g do reagente em água e ajustando o pH a 6,5 com solução 0,2 mol L⁻¹ de HCl e completando o volume para 250 mL.

Um sistema enzimático, LABTEST Diagnóstica (2000), catálogo número 84-2/250, para a determinação de glicose em amostras de soro, com reação de ponto final, foi usado para comparação dos resultados com o sistema de injeção em fluxo proposto. O *kit* comercial é composto de um único reagente contendo tampão 100 mmol L⁻¹, pH 7,4, fenol ≥ 1 mmol L⁻¹, glicose oxidase ≥ 20 KU L⁻¹, peroxidase ≥ 2000 U L⁻¹, azida sódica 15 mmol L⁻¹, 4-aminoantipirina ≥ 300 μ mol L⁻¹, e um padrão de 100 mg dL⁻¹ de glicose. Os reagentes foram acondicionados conforme instruções anexadas ao *kit*.

3.3.3 - Imobilização enzimática

A enzima glicose oxidase foi imobilizada *off line* e depois acondicionada numa mini-coluna. A enzima foi imobilizada, conforme MATSUMOTO et al. (1988), em esferas de vidro (aminopropil), com porosidade de 170 Å e 200-400 mesh.

Uma massa de aproximadamente 0,1 g de esferas de vidro (aminopropil) foi lavada com água e posteriormente com solução de 0,2 mol L⁻¹ tampão carbonato (pH 10,5). Após, as esferas de vidro foram mantidas em solução de 5% (v/v) glutaraldeído por 2 h sob agitação. Em seguida, as esferas foram filtradas e lavadas seqüencialmente com água e solução de 0,1 mol L⁻¹ tampão fosfato (pH 6,0).

A solução de enzima glicose oxidase (150 U) permaneceu em contato com as esferas de vidro por 1 hora a 5 °C. Após essa etapa, as esferas foram

mantidas por 2 h em solução de cianoborohidreto de sódio a 5 °C e, durante 1 h em solução 0,1 mol L⁻¹ de glicina a 25 °C. Em seguida, as esferas foram lavadas com água e solução de 0,1 mol L⁻¹ tampão fosfato (pH 7,5). Terminada a imobilização, as esferas de vidro foram acondicionadas em mini-colunas de acrílico (15 mm x 5 mm d.i.). Quando não estava em uso, a coluna enzimática era mantida em solução de 0,1 mol L⁻¹ tampão fosfato (pH 7,5), sob refrigeração a 5 °C.

Realizaram-se experimentos para verificar a eficiência do procedimento de imobilização, usando solução de enzima glicose oxidase antes e após a etapa da imobilização. Determinou-se a eficiência de imobilização pela adição de 200 µL de solução de enzima glicose oxidase, 200 µL de solução de enzima peroxidase, 1400 µL dos reagentes cromogênicos (700 µL fenol e 700 µL 4-aminoantipirina) e 1400 µL de solução padrão 300 mg L⁻¹ de glicose em uma cubeta de vidro. Imediatamente após a mistura, efetuou-se a leitura de absorvância a cada 10 s por 5 min, em espectrofotômetro com comprimento de onda de 505 nm.

3.3.4 - Descrição do procedimento em fluxo

Na Figura 3.4 é mostrado o diagrama de fluxos do módulo de análise empregado para a determinação de glicose em soro sanguíneo animal utilizando-se o sistema descrito na seção 2.3.5.1.

O sistema constituiu-se de 4 válvulas solenóides, que acionadas pelo microcomputador, via interface, permitiam a inserção de alíquotas das soluções de amostra e reagentes. Na posição indicada na Figura 3.4, todas as válvulas V₁, V₂, V₃ e V₄ estão desligadas, e apenas a solução transportadora (C), bombeada a 2,1 mL min⁻¹, está fluindo através do percurso analítico (reator tubular helicoidal (B) e coluna enzimática (GOD)) em direção ao detector (DET). Empregaram-se vazões de 2,1 mL min⁻¹ para o carregador, 1,4 mL min⁻¹ para a amostra e 1,2 mL min⁻¹ para os reagentes, conforme descritos na legenda da Figura 3.4.

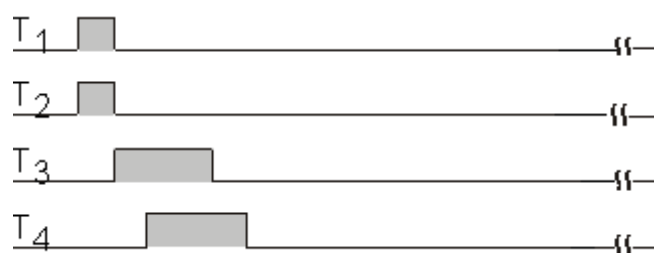
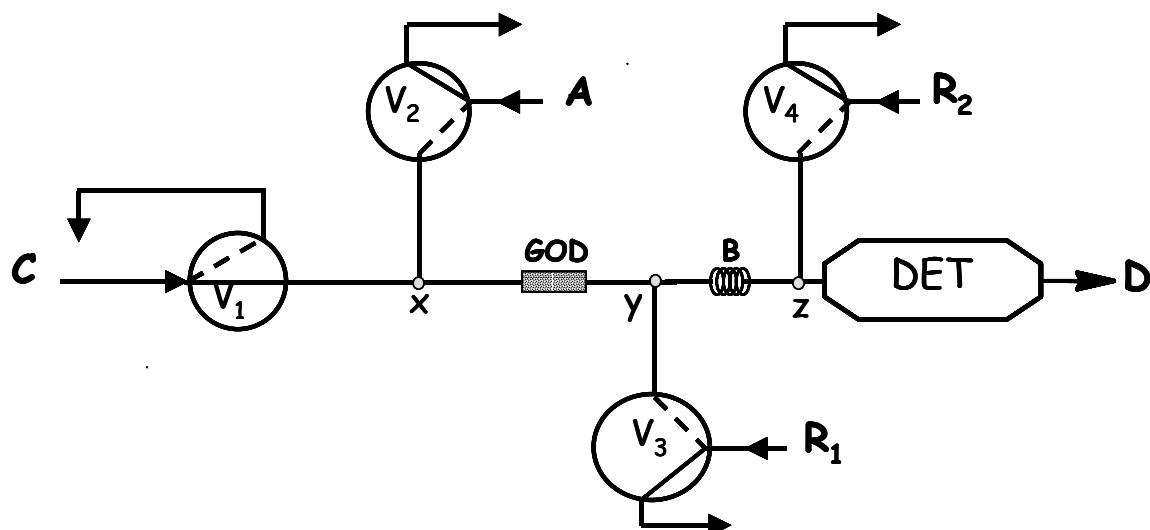


FIGURA 3.4 - Diagrama de fluxos do módulo de análise para a determinação de glicose. V_1 , V_2 , V_3 e V_4 - válvulas solenóides de três vias, A - amostra (vazão de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$), C - carregador, tampão fosfato pH 7,5 (vazão de $2,1 \text{ mL min}^{-1}$), R_1 - solução de luminol, $2,5 \text{ mmolL}^{-1}$ pH 10,5 (vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$), R_2 - solução de hexacianoferrato (III), $0,1 \text{ molL}^{-1}$ (vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$), x, y, z - pontos de confluência, GOD - coluna enzimática, B - reator tubular helicoidal (0,8 mm d.i., 75 cm), DET - detector quimiluminescente, D - descarte, linhas sólida e tracejada dentro das válvulas indicam o caminho de fluxo quando a válvula é ligada ou desligada, respectivamente. Setas indicam a direção do bombeamento. T_1, T_2, T_3 e T_4 - tempo de acionamento das válvulas V_1 , V_2 , V_3 e V_4 , a superfície sombreada no diagrama de tempo de acionamento das válvulas indicam o momento em que as válvulas estão ligadas.

Utilizou-se um espectrofotômetro convencional, onde a fonte de radiação foi bloqueada utilizando-se a cela para a detecção quimiluminescente, apresentada na Figura 3.3.

Durante o acionamento das válvulas V_1 e V_2 , o fluxo da solução transportadora foi interrompido, e a solução da amostra foi introduzida no percurso analítico através do ponto da confluência x , de acordo com os diagramas de tempo T_1 e T_2 . A solução da amostra foi transportada em direção à coluna enzimática GOD, onde ocorreu a reação. As soluções dos reagentes R_1 e R_2 estavam sendo recuperadas, nesse momento. Após a introdução da amostra, as duas válvulas V_1 e V_2 foram desligadas, e a solução transportadora voltou a fluir no percurso analítico. Em seguida, foi acionada a válvula V_3 para a inserção do reagente luminol no percurso analítico através do ponto de confluência y . Enquanto a mistura amostra e reagente (R_1) foi transportada à bobina (B), indo em direção ao detector, foi acionada a válvula V_4 para a inserção do reagente hexacianoferrato (III) (R_2) diretamente na cela de detecção. Após a inserção dos reagentes, as válvulas foram desligadas e apenas a solução transportadora voltou a fluir no percurso analítico.

Alguns experimentos foram conduzidos empregando-se o sistema mostrado na Figura 3.4. Estudaram-se os principais parâmetros envolvidos no desenvolvimento da reação enzimática para a determinação de glicose tais como intervalo de tempo para acionamento das válvulas, vazões de bombeamento das soluções, concentrações dos reagentes, comprimento do reator tubular helicoidal, concentração hidrogeniônica e temperatura. Inicialmente, esses parâmetros foram avaliados a temperatura ambiente (25 °C), usando solução de referência contendo 300 mg L⁻¹ de glicose.

3.3.4.1 - Estudo do intervalo de tempo para acionamento de válvulas

O intervalo de tempo de acionamento da válvula V_2 definia o volume da solução da amostra inserido no percurso analítico, considerando-se uma vazão fixa de bombeamento da solução da amostra. Para este estudo, foram avaliados os intervalos de tempo de acionamento de V_2 em 1, 2, 3 e 4 s.

Investigaram-se, também, os intervalos de tempo de acionamento das válvulas V_3 e V_4 para inserção dos reagentes luminol e hexacianoferrato (III).

Avaliaram-se, então, intervalos de tempo de acionamento das válvulas entre 6 e 22 s.

3.3.4.2 - Influência da vazão de bombeamento das soluções

A influência da vazão da solução transportadora e dos reagentes foi avaliada fixando-se a vazão de bombeamento da amostra em $1,4 \text{ mL min}^{-1}$ e variando-se as vazões de bombeamento da solução transportadora e reagentes em 1,2; 1,4; 2,1; 2,6 e $3,2 \text{ mL min}^{-1}$ e 0,9; 1,2; 1,4; 2,1 e $2,6 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente.

3.3.4.3 - Influência do comprimento do reator tubular helicoidal

O comprimento do reator tubular helicoidal está relacionado ao intervalo de tempo disponível para o desenvolvimento da reação do peróxido de hidrogênio com o luminol (R_1). Assim, após estabelecer as melhores condições de introdução das alíquotas de amostra e reagentes, variou-se o comprimento do reator tubular helicoidal em 25, 50, 75 e 100 cm.

3.3.4.4 - Influência das concentrações dos reagentes

As concentrações dos reagentes R_1 e R_2 influenciam na intensidade quimiluminescente. Com a finalidade de se obter as concentrações mais adequadas dos reagentes luminol e hexacianoferrato (III) para o sistema proposto variaram-se as concentrações em 0,5; 1,5; 2,5; 3,5 e $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$, e em 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

3.3.4.5 - Influência da concentração hidrogeniônica

Acima e abaixo do valor de pH ótimo, a atividade da enzima decresce resultando na formação de uma forma iônica imprópria do substrato ou da própria enzima. Assim, avaliou-se a influência da concentração hidrogeniônica sobre o

desenvolvimento da reação enzimática preparando-se solução fosfato em pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0.

3.3.4.6 - Influência da temperatura

A temperatura influencia na reação enzimática podendo melhorar ou não a eficiência da reação. Contudo, avaliou-se a influência de variação da temperatura sobre a reação enzimática submergindo-se a coluna GOD em um banho de temperatura controlada. As temperaturas investigadas foram 18, 25, 30, 40 e 50 °C.

3.3.4.7 - Determinação de glicose em amostras de soro sanguíneo animal

A determinação de glicose foi realizada em amostras de soro sanguíneo, provenientes de ovinos e bovinos, empregando-se o sistema da Figura 3.4. As amostras foram inseridas em triplicata. Os resultados obtidos com o procedimento proposto foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o procedimento manual de análises.

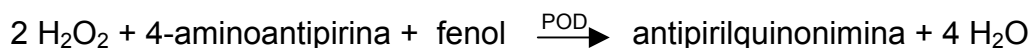
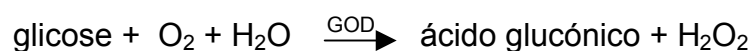
3.3.4.8 - Avaliação da estabilidade da coluna enzimática

Avaliou-se a estabilidade da coluna enzimática inserindo-se, consecutivamente, alíquotas de amostras durante 6 h de trabalho. Entre intervalos de 2 h de trabalho, inseriu-se no sistema a solução de referência contendo 300 mg L⁻¹ de glicose.

3.3.5 - Procedimento manual

Para a comparação de resultados, analisaram-se as amostras para a determinação de glicose empregando-se o *kit* comercial, LABTEST Diagnóstica

(2000). Determinou-se a glicose de acordo com as seguintes reações e procedendo-se da maneira descrita abaixo, conforme as instruções do fabricante.



A enzima glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose formando ácido glucónico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento que forma a antipirilquinonimina cuja intensidade da cor vermelha é proporcional à concentração de glicose na amostra.

Em três tubos de ensaio denominados de branco, teste e padrão, utilizando-se micro-pipetas, transferiram-se 3 mL da solução reagente contendo tampão 100 mmol L⁻¹ pH 7,4, fenol ≥ 1 mmol L⁻¹, glicose oxidase ≥ 20 KU L⁻¹, peroxidase ≥ 2000 U L⁻¹, azida sódica 15 mmol L⁻¹ e 4-aminoantipirina ≥ 300 μmol L⁻¹. Adicionaram-se, em seguida, aos respectivos tubos de ensaio (teste e padrão), 30 μL das soluções de amostra e padrão. Misturaram-se as soluções dos tubos agitando-se lentamente, e em seguida, colocaram-se os tubos de ensaio em suporte, levando-se posteriormente, para um banho com temperatura controlada a 37 °C por 15 min. O nível da água do banho foi superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Retirou-se o suporte do banho e determinaram-se as medidas de absorvância das soluções contidas nos tubos do teste e padrão, a 510 nm, empregando-se um espectrofotômetro UV/Vis equipado com cubeta de vidro com 4 mL de volume interno, acertando o zero com o branco. A cor foi estável por 60 min.

Realizou-se a determinação de glicose em cada amostra, em triplicata, e a concentração foi calculada da forma recomendada pelo manual de instruções do *kit*:

$$\text{Glicose (mg dL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{absorvância do teste}}{\text{absorvância do padrão}} \times 100$$

3.3.6 - Amostras

Estabeleceram-se procedimentos adequados para a coleta e armazenamento da amostra. As amostras de sangue foram coletadas segundo procedimentos recomendados por CHRISTIAN (1986), JOINT FAO/IAEA PROGRAMME (1993a) e NOGUEIRA et al. (1998), cujos detalhes foram descritos no Capítulo 2 (seção 2.3.4).

Enfatiza-se que o erro devido à amostragem pode ser maior que os erros ocorridos durante o procedimento analítico. No plasma, soro e outros líquidos separados das células, a glicose permanece estável por três dias se mantida em temperatura entre 2 e 8 °C, quando não ocorre contaminação bacteriana, TIETZ (1970).

3.4 - Resultados e discussão

O sistema proposto e apresentado na Figura 3.4, para a determinação de glicose em soro sanguíneo animal, foi desenvolvido baseando-se no conceito de multicomutação, com o intuito de se recorrer a procedimentos automatizados, devido aos procedimentos manuais envolverem etapas lentas, trabalhosas e dispendiosas. Um aspecto favorável da automatização de métodos analíticos é a possibilidade de se trabalhar com volumes pequenos de soluções, minimizando contaminações ao meio ambiente, possibilitando também a realização de um maior número de determinações por amostra.

Nesses estudos, os principais parâmetros envolvidos foram avaliados, inicialmente, a temperatura do ambiente, ou seja, 25 °C. A faixa analítica de concentração da glicose foi definida entre 50 e 600 mg L⁻¹.

Em sistemas baseados no conceito de multicomutação, as alíquotas das soluções inseridas são definidas pelo intervalo de tempo de acionamento das válvulas solenóides e pela vazão de bombeamento das soluções. Realizou-se assim, um estudo do tempo de acionamento das válvulas V₂, V₃ e V₄. Inicialmente, neste estudo, as vazões da solução transportadora (C), da amostra (A) e dos reagentes (R₁) e (R₂) foram respectivamente de 3,2; 1,4 e 1,2 mL min⁻¹, e o reator tubular

helicoidal dimensionado, primeiramente, com comprimento de 50 cm e diâmetro interno de 0,8 mm.

Estudou-se o volume de amostra a ser introduzido no percurso analítico para a determinação de glicose inserindo-se uma solução de 300 mg L^{-1} de glicose e variando-se o tempo de abertura da válvula V_2 em 1, 2, 3 e 4 s. Empregando-se esses intervalos de tempo, os volumes inseridos da solução da amostra eram de 23, 46, 70 e $93 \mu\text{L}$, respectivamente. O intervalo de tempo de 2 s ($46 \mu\text{L}$) foi escolhido por apresentar um bom compromisso entre magnitude do sinal e precisão das medidas.

Estudaram-se, também, os intervalos de tempo de acionamento das válvulas V_3 e V_4 para inserção dos reagentes luminol e hexacianoferrato (III). Para isso, empregaram-se intervalos de tempo de acionamento das válvulas V_3 e V_4 em 6, 12, 16, 18 e 22 s. Os volumes inseridos das soluções R_1 e R_2 , empregando-se esses intervalos de tempo, eram de 120, 240, 320, 360 e $440 \mu\text{L}$, respectivamente. Os intervalos de tempo de 18 e 16 s, para a inserção da solução de luminol e hexacianoferrato (III) foram selecionados, pois apresentaram maior magnitude no sinal analítico.

A influência dos volumes dos reagentes, luminol e hexacianoferrato (III) e da amostra sobre o sinal analítico pela variação dos intervalos de tempo de acionamento das válvulas, pode ser observada na Tabela 3.1.

TABELA 3.1 - Influência dos volumes da amostra e reagentes sobre o sinal analítico.

Amostra volume (μL)	Reagente R ₁ volume (μL)	Reagente R ₂ volume (μL)	Sinal (mV)
23	240	120	10,6
46	240	120	17,8
70	240	120	18,2
93	240	120	18,0
46	120	120	12,6
46	240	120	17,9
46	320	120	19,1
46	360	120	21,2
46	440	120	17,0
46	360	120	21,2
46	360	240	24,2
46	360	320	30,6
46	360	360	28,6
46	360	440	28,4

Amostra = 300 mg L⁻¹ solução de referência de glicose

R₁ = 2,5 mmol L⁻¹ solução luminol

R₂ = 0,1 mol L⁻¹ solução hexacianoferrato (III)

Avaliou-se a influência das vazões da solução transportadora e dos reagentes, fixando-se a vazão de bombeamento da amostra em 1,4 mL min⁻¹ e variando-se as vazões de bombeamento da solução transportadora (C) e reagentes (R₁) e (R₂) em 1,2; 1,4; 2,1; 2,6 e 3,2 mL min⁻¹ e 0,9; 1,2; 1,4; 2,1 e 2,6 mL min⁻¹, respectivamente. Pôde-se verificar um aumento significativo na magnitude dos sinais com a diminuição da vazão de bombeamento da solução transportadora através do percurso analítico. Desse resultado, apresentado na Figura 3.5, pode-se constatar que com vazões acima de 2,1 mL min⁻¹, havia o efeito de diluição prejudicando assim, a sensibilidade do método. Para vazões menores, o procedimento tornava-se demorado, nesse caso, manteve-se a vazão de 2,1 mL min⁻¹. As vazões de bombeamento das soluções dos reagentes luminol e hexacianoferrato (III) foram

investigadas e, em termos de sensibilidade e linearidade, a vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ foi selecionada para ambos os reagentes.

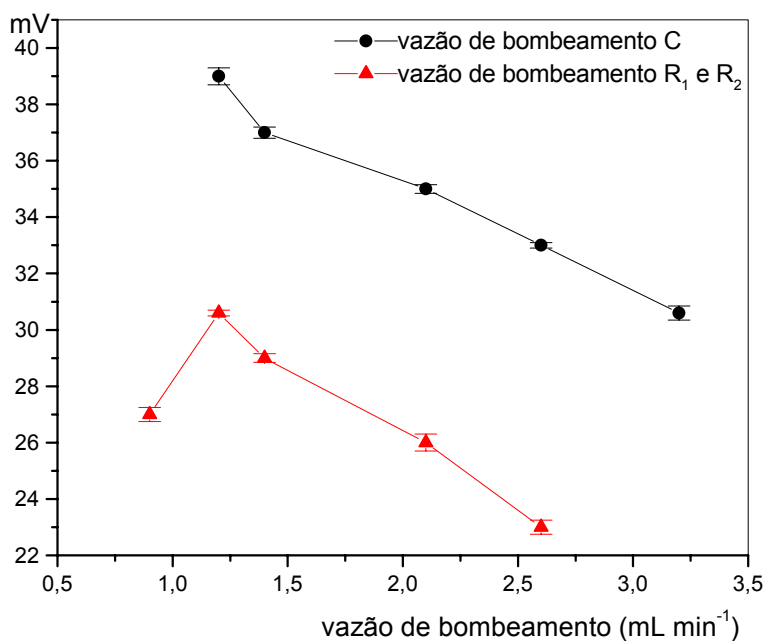


FIGURA 3.5 - Influência da vazão de bombeamento da solução transportadora (C) e das soluções dos reagentes luminol (R₁) e hexacianoferrato (III) (R₂) sobre a magnitude do sinal analítico, n=3. Estudo realizado com o sistema da Figura 3.4.

Após estabelecer as melhores condições de introdução das alíquotas das soluções de amostra e reagentes para a determinação de glicose, variou-se o comprimento do reator tubular helicoidal em 25, 50, 75 e 100 cm. O comprimento do reator tubular helicoidal está relacionado ao intervalo de tempo disponível para o desenvolvimento da reação do peróxido de hidrogênio com o luminol. Observou-se aumento do sinal analítico e sensibilidade quando se empregou o comprimento de 75 cm, quando comparados aos obtidos com o reator de 25, 50 e 100 cm de comprimento. Assim, foi selecionado o comprimento de 75 cm para o reator tubular helicoidal, obtendo-se uma melhoria na magnitude do sinal.

Estudaram-se as concentrações dos reagentes luminol e hexacianoferrato (III) no sistema proposto, variando-se as mesmas em 0,5; 1,5; 2,5; 3,5 e 4,5 mmol L⁻¹, e em 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mol L⁻¹, respectivamente.

Pode-se observar na Figura 3.6 que, entre a faixa de concentração de 0,5 e 2,5 mmol L⁻¹, a magnitude do sinal aumentou e, após a concentração de 2,5 mmol L⁻¹, a magnitude do sinal permaneceu constante. Desse modo, optou-se pelo uso da solução contendo 2,5 mmol L⁻¹ de luminol, por ter apresentado uma melhor condição estequiométrica para a produção máxima da radiação eletromagnética decorrente da reação quimiluminescente. Assim, fixou-se essa concentração para a continuidade do desenvolvimento do procedimento proposto.

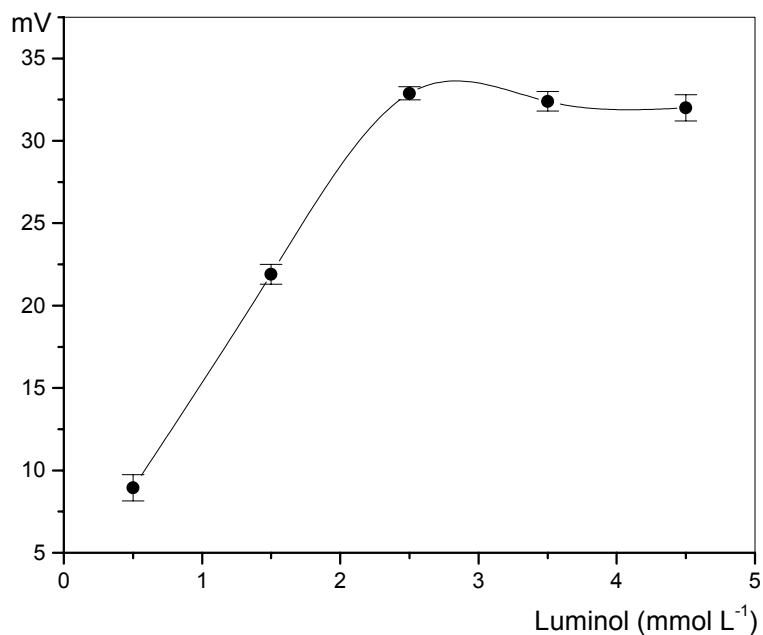


FIGURA 3.6 - Influência da concentração do luminol sobre o sinal analítico, n=3. Estudo realizado com o sistema da Figura 3.4.

Posteriormente, verificou-se a influência da concentração do catalisador hexacianoferrato (III) na reação quimiluminescente. Para isso, variou-se a concentração do reagente entre 0,01 e 0,5 mol L⁻¹ e os resultados são mostrados na Figura 3.7. De acordo com a Figura 3.7, pode-se observar que a magnitude do

sinal analítico aumenta até a concentração de $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e, em seguida, o sinal analítico decresce em função do aumento da concentração. Esses resultados foram concordantes com os resultados apresentados por RIDDER et al. (1982). Entretanto, fixou-se a concentração da solução de hexacianoferrato (III) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pois a sensibilidade observada na magnitude do sinal analítico foi suficiente para a determinação de glicose em amostras de soro sanguíneo animal. Além disso, obteve-se menor consumo de reagente por determinação.

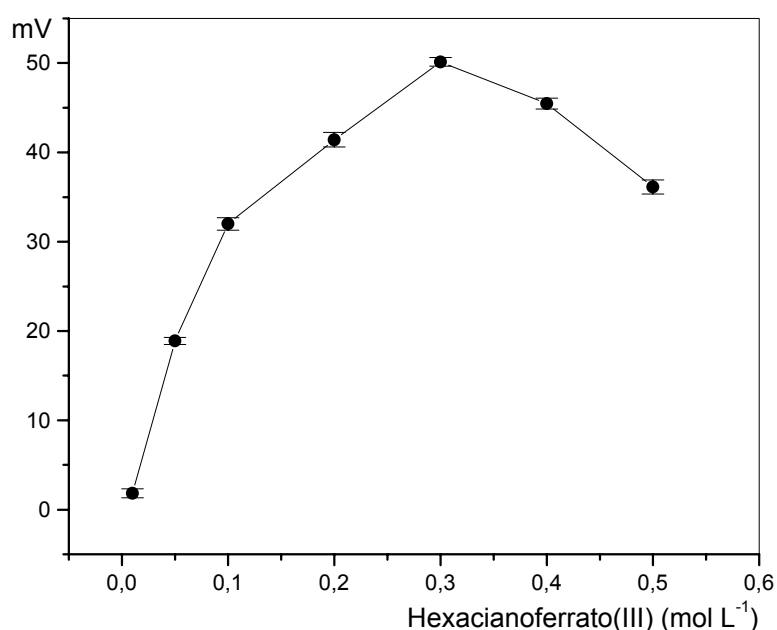


FIGURA 3.7 - Influência da concentração do hexacianoferrato (III) sobre o sinal analítico, $n=3$. Estudo realizado com o sistema da Figura 3.4.

De acordo com a literatura, SUELTER (1985) e RICARDO e TEIXEIRA (1993), o pH e a temperatura influenciam fortemente o desenvolvimento das reações enzimáticas. Para toda reação existe um pH e temperatura ótimos, nos quais as enzimas têm atividades máximas. Contudo, avaliou-se a influência da concentração hidrogeniônica sobre o desenvolvimento da reação enzimática preparando-se solução fosfato (solução transportadora) em pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0. Pode-se observar na Figura 3.8 que a magnitude do sinal analítico aumentou à medida que o

pH aumentou, contudo, para valores acima de 7,5 houve diminuição do sinal. Considerando-se esse resultado, a solução fosfato foi preparada em pH 7,5.

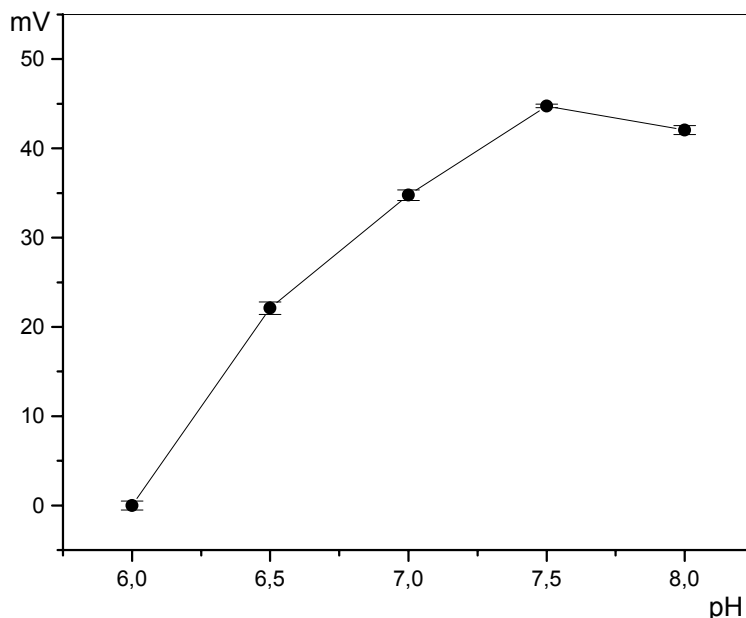


FIGURA 3.8 - Influência da concentração hidrogeniônica sobre a reação enzimática, n=3. Estudo realizado com o sistema da Figura 3.4.

Para toda a reação existe uma temperatura ótima, como mencionado anteriormente. A temperatura ótima é aquela em que o máximo de sinal pode ser obtido antes que a enzima comece a perder sua estabilidade, devido ao processo de desnaturação causado com o aumento da temperatura. Assim, avaliou-se a influência de variação da temperatura sobre a reação enzimática submergindo-se a coluna GOD em um banho de temperatura controlada. As temperaturas investigadas foram 18, 25, 30, 40 e 50 °C e o resultado é mostrado na Figura 3.9. Observa-se que houve aumento de apenas 9,7% na magnitude do sinal analítico quando variou-se a temperatura de 25 a 30 °C. Desse modo, optou-se em trabalhar a uma temperatura de 25 °C (temperatura ambiente) evitando, assim, o uso do banho com temperatura controlada e possíveis formações de micro-bolhas de ar.

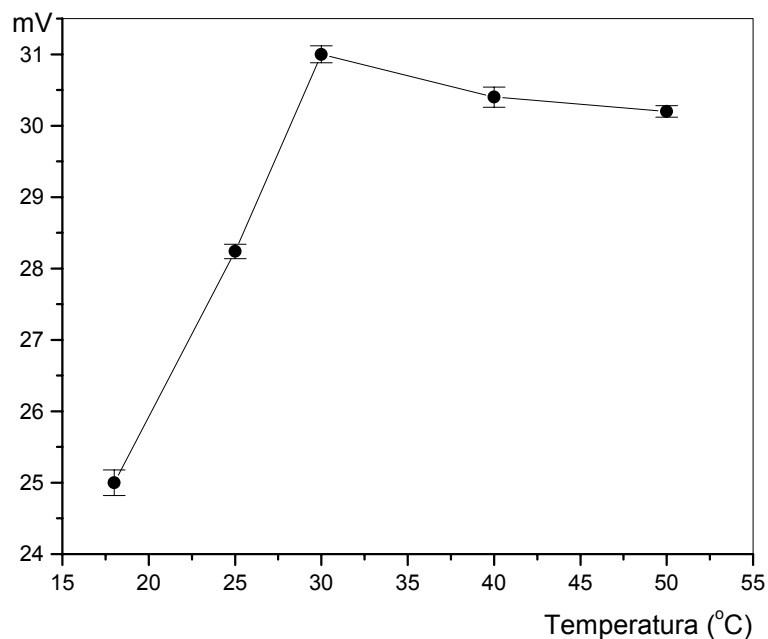


FIGURA 3.9 - Influência da temperatura sobre a reação enzimática, n=3. Estudo realizado com o sistema da Figura 3.4.

Definidos os parâmetros acima descritos, avaliou-se a influência da matriz da amostra na determinação de glicose. Para tanto, empregou-se o método da adição-padrão e realizaram-se posteriormente, cálculos de recuperação. Adicionaram-se soluções de referência de 100, 300 e 500 mg L⁻¹ de glicose à amostra de soro sanguíneo animal. As recuperações encontradas situaram-se entre 93 e 110%, demonstrando que não houve efeito de matriz sobre as determinações.

Com relação à eficiência do procedimento de imobilização, realizaram-se experimentos usando solução de enzima glicose oxidase antes e após a etapa da imobilização. Assim, obteve-se eficiência de 85% de imobilização da enzima glicose oxidase.

Observa-se na Figura 3.10 o registro dos sinais transientes, obtidos com soluções de referências entre 50 e 600 mg L⁻¹ de glicose. No decorrer de um período de 6 horas de trabalho, notou-se boa estabilidade da linha base e boa repetibilidade das medidas.

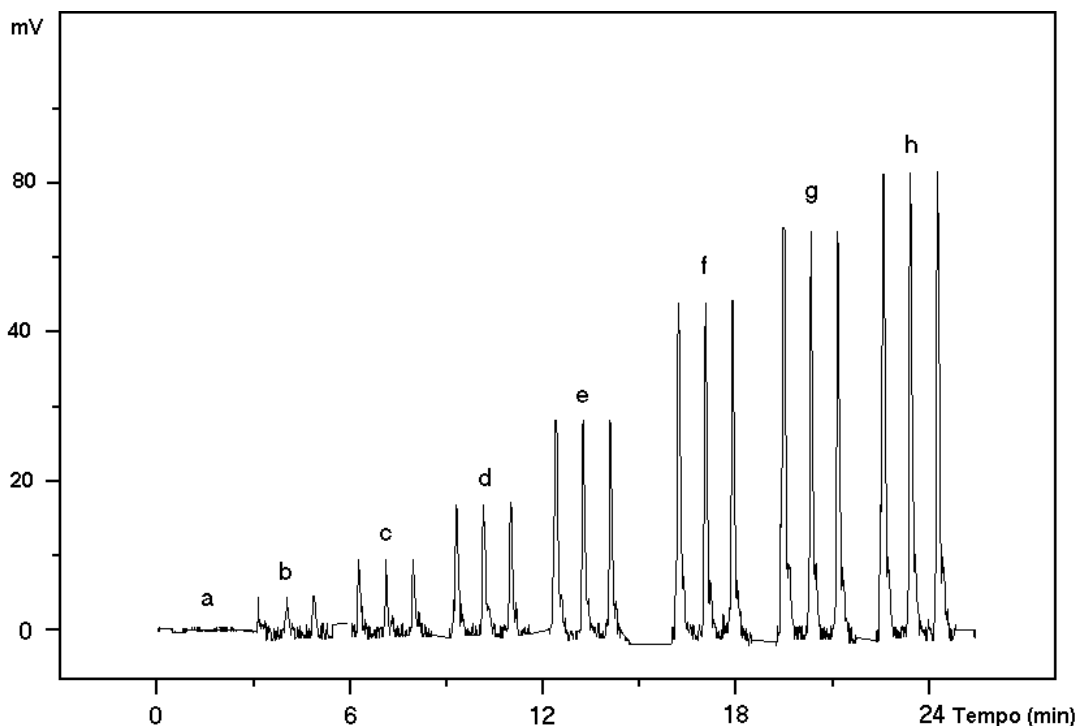


FIGURA 3.10 - Registro dos sinais transientes referentes à determinação de glicose em soro de sangue animal. Soluções de referências contendo (a) 0, (b) 50, (c) 100, (d) 200, (e) 300, (f) 400, (g) 500 e (h) 600 mg L⁻¹ de glicose.

Nas condições de trabalho propostas, a frequência analítica foi de 60 determinações por hora, desvio padrão relativo de 3,5% (n=20) estimado para uma amostra de soro sanguíneo contendo 300 mg L⁻¹ de glicose, e limite de detecção de 12 mg L⁻¹ de glicose. O consumo de reagentes foi de 0,2 mg de luminol e 10 mg de hexacianoferrato (III) por determinação. Nessas condições, obteve-se resposta linear para a faixa de concentrações entre 50 e 600 mg L⁻¹ de glicose e coeficiente de correlação $r = 0,997$ ($y = 2,485 + 0,147 x$, sendo $y =$ absorvância e $x =$ concentração).

Amostras de soro sanguíneo animal foram analisadas sem tratamento prévio, empregando-se o sistema da Figura 3.4, e os resultados foram comparados com os resultados obtidos empregando-se o procedimento manual (LABTEST-Kit). Os resultados estão apresentados na Tabela 3.2 e demonstraram boa concordância

entre os mesmos. Aplicando-se o teste *t*, observou-se que não há diferença significativa entre os resultados em nível de confiança de 95%.

TABELA 3.2 - Comparação de resultados obtidos na determinação de glicose em amostras^a de soro sanguíneo animal empregando o sistema proposto e o procedimento manual de análises.

Amostra	Sistema proposto (mg L ⁻¹)	LABTEST-Kit
ovino	203 ± 7	199 ± 9
ovino	190 ± 3	186 ± 7
ovino	135 ± 4	138 ± 8
ovino	132 ± 1	135 ± 3
ovino	132 ± 11	117 ± 15
ovino	171 ± 4	173 ± 3
ovino	183 ± 1	182 ± 2
ovino	191 ± 2	189 ± 3
bovino	220 ± 2	219 ± 2
bovino	208 ± 3	205 ± 4
bovino	202 ± 6	205 ± 3
bovino	218 ± 3	217 ± 4
bovino	231 ± 2	228 ± 3
bovino	215 ± 4	212 ± 5
bovino	215 ± 4	212 ± 7

^a Resultados representam médias e desvio padrão a partir de 3 replicatas

Avaliou-se a estabilidade da coluna enzimática inserindo-se, sucessivamente, alíquotas de amostras e entre intervalos de 2 h de trabalho solução de referência contendo 300 mg L⁻¹ de glicose. Observou-se uma diminuição de 6% na magnitude dos sinais obtidos durante um dia de trabalho. Assim, com a coluna enzimática contendo a enzima (GOD), foi possível realizar 1200 determinações.

Na Tabela 3.3 estão apresentados dados de alguns parâmetros obtidos dos procedimentos em fluxo e manual. Pode-se observar que para o sistema proposto obteve-se uma redução do volume de reagente, e conseqüentemente, de efluente gerado quando comparado ao procedimento manual. Com o sistema proposto foi possível eliminar o uso do reagente fenol empregado no procedimento manual para a formação do composto cromogênico monitorado espectrofotometricamente. Outra vantagem, em relação ao procedimento manual, foi à freqüência de amostragem de 60 determinações por hora. A freqüência de amostragem no procedimento manual depende muito da agilidade do analista, nesse caso, obteve-se freqüência de 12 determinações por hora. A manipulação das amostras foi menor para o procedimento proposto, evitando possíveis contaminações. Adicionado a isso, para o procedimento proposto, o custo foi menor por determinação, porém, deve-se ressaltar as melhorias obtidas por esse procedimento em relação ao procedimento manual. A estimativa para o cálculo do custo dos procedimentos por determinação de amostra foi realizada conforme o cálculo do custo dos procedimentos para a determinação de 3-hidroxiacetato. Consideraram-se, também, apenas os preços das soluções usadas para as determinações de glicose, excluindo os preços de equipamentos e mão-de-obra do analista.

TABELA 3.3 - Comparação entre o procedimento proposto e o procedimento manual.

Parâmetros	Procedimentos	
	Proposto	Manual
Volume de amostra	46 μL	30 μL
Consumo de reagentes	360 e 320 μL	9000 μL
Efluente gerado	2760 μL	9060 μL
Freqüência de amostragem	60 det./h	?
Manuseio da amostra	<	>
Custo por determinação	R\$ 0,19	R\$ 0,74

3.5 - Conclusões

O sistema proposto para a determinação de glicose em soro sanguíneo animal demonstrou estabilidade e facilidade operacional.

Empregando-se a coluna enzimática (GOD) foi possível realizar 1200 determinações de glicose em amostras obtendo-se uma diminuição de 20% na magnitude dos sinais.

Com a implementação da multicomutação no sistema FIA proposto foi possível reduzir os volumes de soluções de reagentes minimizando, assim, o custo por determinação de amostras. Além de diminuir o volume de efluentes gerados, o sistema proposto, também apresentou uma maior rapidez na emissão de resultados e menor manipulação das amostras quando comparados com o procedimento manual de análise.

Essas vantagens tornam-se o sistema FIA proposto uma excelente ferramenta para determinações de importantes constituintes bioquímicos encontrados no sangue animal, sendo recomendado para aplicação em larga escala.

CAPÍTULO 4. SISTEMA DE FLUXO EMPREGANDO MULTICOMUTAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL EM AMOSTRAS DE SANGUE ANIMAL POR QUIMILUMINESCÊNCIA*

4.1 - Introdução

A relação entre dieta alimentar e saúde animal está cada vez mais evidente em trabalhos realizados sobre o assunto. Com isso, hoje em dia, os pesquisadores da área de ciências e nutrição animal mostram-se mais preocupados e interessados em saber o que realmente os animais estão consumindo.

O colesterol é uma substância pertencente ao grupo de lipídeos, presente predominantemente no reino animal. Desempenha funções importantes no organismo animal, sendo constituinte normal e essencial das membranas celulares e das lipoproteínas. É a chave intermediária na produção dos ácidos biliares, precursor de hormônios e participa da síntese da provitamina D₃, BRACO et al. (1990).

A determinação de colesterol em fluidos biológicos é requerida em diagnósticos clínicos como importante parâmetro na avaliação das funções hepáticas do animal, COLES (1980). As determinações de colesterol são normalmente executadas empregando procedimento manual de análises. Os procedimentos manuais, apesar de apresentarem boa exatidão, têm como limitação a precisão das medidas, o tempo gasto por análise, o volume do reagente empregado, o volume do efluente gerado e a quantidade de materiais a serem descontaminados. Além disso, as análises para determinação de colesterol através de procedimentos manuais são normalmente dispendiosas e complicadas, e os métodos variam largamente em custo, exatidão, precisão e complexidade.

Considerando tais aspectos, o desenvolvimento do sistema em fluxo empregando multicomutação com detecção quimiluminescente para a determinação de colesterol em soro de sangue animal tem como objetivo a obtenção de um procedimento simples, prático e rápido na obtenção de resultados.

* Analytical Letters, 36(14): 3011, 2003

4.2 - Revisão de literatura

4.2.1 - Aspectos gerais

Cada vez mais a clínica de animais necessita de complementação de exames laboratoriais. Dentre os exames bioquímicos disponíveis, aqueles que correspondem à avaliação hepática são os mais solicitados, AMARAL et al. (1995/1996). A quantificação de parâmetro como o colesterol, como meio auxiliar ao diagnóstico de hepatopatias em animais foi sugerido por Rogers, citado por FENNER (1985).

O colesterol é uma substância de natureza hidrofóbica (Figura 4.1), solúvel em solventes de baixa polaridade. Na sua forma pura, o colesterol é um sólido cristalino, branco, insípido e inodoro. É um membro da família dos esteróides, sintetizado pelo fígado em um processo regulado por um sistema compensatório: quanto maior for a ingestão de colesterol vindo dos alimentos, menor é a quantidade sintetizada pelo fígado. O colesterol pode ser encontrado na forma livre (molécula anfipática) ou na forma esterificada, sendo essa em maior quantidade, combinada com uma longa cadeia de ácidos graxos. Colesterol e ácidos graxos, na forma de triglicerídeos, são insolúveis em água, mas são transportados pelo sangue embrulhados em proteínas formando complexos, denominados de lipoproteína. As lipoproteínas são divididas em várias classes, dentre essas se destacam as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que são pequenas e densas para atravessar os vasos sanguíneos e se ligarem às membranas das células dos tecidos, estando associadas com os altos índices de doenças cardiovasculares, e as lipoproteínas de alta densidade (HDL) que são responsáveis pelo transporte reverso do colesterol, isto é, carrega o colesterol em excesso de volta para o fígado, QUÍMICA-Universidade Federal de Santa Catarina (2003).

Considerando-se que os humanos carregam cerca de 70% de colesterol LDL no sangue, na maioria dos animais predomina o colesterol HDL, McNAMARA (2000). Dados epidemiológicos e estudos experimentais em animais demonstraram uma correlação positiva entre os níveis de colesterol LDL e o risco de doença arterial coronariana. Paralelamente a isso, foi evidenciado que os níveis de

colesterol HDL são inversamente proporcionais ao risco de doença arterial coronariana, LABTEST Diagnóstica (1999).

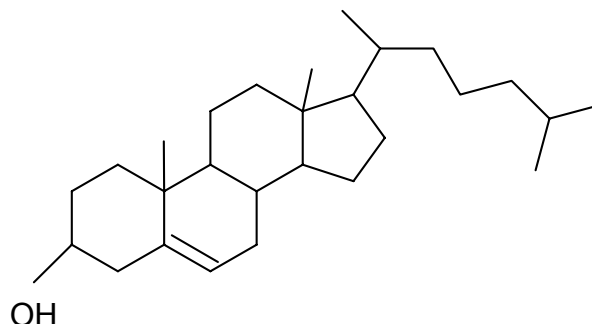


FIGURA 4.1 - Fórmula estrutural da molécula de colesterol.

O colesterol sérico pode ser de origem dietética ou resultante da síntese no fígado e em vários outros tecidos, a partir de precursores acetato, KANEKO (1989). MEYER et al. (1992) comentam que o fígado é o ponto focal da eliminação do colesterol do organismo, sob a forma de ácidos biliares.

4.2.2 - Significado clínico da concentração de colesterol em soro animal

Os valores de referência de colesterol no soro sanguíneo animal situam-se entre 550 e 2710 mg L⁻¹ para animais clinicamente sadios e em boas condições nutricionais.

As alterações na concentração de colesterol podem ser devidas a vários fatores, tais como deficiência protéica na dieta, desnutrição, infecções, traumas, malefício nos rins, fígado e intestino.

A molécula de colesterol desempenha uma ampla variedade de funções, entre elas, reserva de energia, isolamento e proteção dos órgãos. Dados obtidos de pesquisas com animais indicaram que o aumento de níveis de colesterol HDL diminui a progressão de arteriosclerose (endurecimento das artérias), RADER

(1999). Baixos níveis de colesterol, na dieta de animais em desenvolvimento, têm ocasionado diminuição da concentração de testosterona, BLUNT (1977).

A taxa de síntese de colesterol no fígado está relacionada com o nível ingerido na dieta, a biossíntese endógena diminui quando aumenta o colesterol exógeno. Durante a gestação, os níveis de colesterol têm valores máximos em função do aumento da síntese de esteróides gonadais, GONZÁLEZ (2000).

Os resultados das análises de amostras de animais com obstrução biliar extra-hepática indicam hipercolesterolemia, a qual pode ocorrer após anomalias vasculares portais congênitos, mas sua causa é desconhecida, AMARAL et al. (1995/1996).

4.2.3 - Métodos analíticos para a determinação de colesterol

Diversos métodos têm sido desenvolvidos ao longo de muitos anos para a determinação de colesterol em diversos tipos de amostras de sangue, alimentos, etc., no sentido de buscar dados precisos e exatos. Os principais métodos analíticos para análise de colesterol podem ser divididos em três grupos: colorimétricos, enzimáticos e cromatográficos. O procedimento colorimétrico é o mais barato e tem sido o mais utilizado, contudo, muito se discute sobre a falta de especificidade do método. O método enzimático é considerado menos oneroso e o mais específico. Os métodos cromatográficos são considerados mais caros.

ALLAIN et al. (1974) desenvolveram um procedimento baseado em reações enzimáticas, envolvendo três enzimas, para a determinação de colesterol total em soro. O método apresentou uma curva linear até 600 mg dL^{-1} necessitando, entretanto, do tratamento das amostras. O colesterol éster foi hidrolisado a colesterol livre pela colesterol esterase. O colesterol livre produzido foi oxidado pela colesterol oxidase a colesteno com a produção simultânea do peróxido de hidrogênio, o qual oxidava a 4-aminoantipirina e fenol na presença da peroxidase, onde a absorção máxima observada foi a 500 nm. O método foi reproduzível, com boa precisão.

HUANG et al. (1977) desenvolveram um método eletroquímico simples, rápido e econômico para a determinação de colesterol total em soro, usando as enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase imobilizadas. O peróxido de hidrogênio resultante das reações catalíticas foi medida amperometricamente a

+0,60 V versus o eletrodo de referência de calomelano. A curva analítica foi linear entre 0,1 e 5,0 g L⁻¹. A imobilização das enzimas foi estável, podendo ser usada, no mínimo, para 200 determinações, e o coeficiente de correlação foi de 0,992.

Um método para a determinação amperométrica enzimática de colesterol total em soro humano foi desenvolvido por HAHN e OLSON (1979). Para isso, os autores utilizaram as enzimas colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase. O peróxido de hidrogênio produzido pela enzima oxidase foi acoplado, via peroxidase, para a produção de K₃Fe(CN)₆, o qual foi medido pelo eletrodo de carbono. O método mostrou boa reprodutibilidade, precisão e sensibilidade. Os resultados obtidos pelo método amperométrico mostraram excelente concordância com o obtido pelo método Leffler.

A combinação do uso de colesterol esterase e oxidase para a determinação de colesterol em soro foi estudado por TABATA et al. (1981). 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 dentro de um sistema em fluxo de um *Auto-Analyser I*. O peróxido de hidrogênio produzido pela oxidase foi determinado colorimetricamente usando a peroxidase. De acordo com os resultados obtidos, a co-imobilização na coluna enzimática se mostrou mais eficiente quando comparada com a coluna enzimática que continha a mistura das duas enzimas imobilizadas individualmente.

YAO e WASA (1988) propuseram um sistema em 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 onde 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. Assim, a frequência analítica foi de 10 determinações por hora, que puderam ser processadas com desvio padrão relativo < 2%.

KRUG et al. (1994) propuseram a determinação de colesterol total em soro humano empregando detecção fotométrica por sistema de análises em fluxo. O volume de amostra injetado foi de 70 µL, o qual passou através dos reatores enzimáticos que continham a colesterol esterase e a oxidase, imobilizadas em esferas de vidro. O peróxido de hidrogênio liberado enzimaticamente foi complexado com 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) e catalisado 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, estabelecido para análise clínica baseado na avaliação de ponto final.

SASAMOTO et al. (1995) 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 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. (1996) 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). O limite de detecção de 0,01 mg dL⁻¹ e o desvio padrão relativo para a faixa de 10 e 60 mg dL⁻¹ foi < 5%. Os resultados foram concordantes com o método espectrofotométrico para a determinação de colesterol em soro.

HUANG et al. (1999) desenvolveram um biossensor quimiluminescente adaptado ao 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 faixa de concentração estudada apresentou resposta linear entre 5 x 10⁻⁶ e 1 x 10⁻⁴ g mL⁻¹ e, o limite de detecção foi de 5 x 10⁻⁶ g mL⁻¹.

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. (1999). A colesterol esterase converte o colesterol esterificado a colesterol livre, o qual é oxidado pela colesterol oxidase produzindo o peróxido de hidrogênio. O ferrocianeto (III) é convertido a ferrocianeto (II) pelo peróxido de hidrogênio, catalisado pela peroxidase, e o eletrodo de tungstênio responde à razão de ferrocianeto (III) a ferrocianeto (II). 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 colesterol.

Um método para análise de colesterol total em soro foi desenvolvido por MALIK e PUNDIR (2002) empregando imobilização individual da colesterol esterase e colesterol oxidase e co-imobilização das enzimas em esferas de vidro. A peroxidase também foi imobilizada em esferas de vidro. O colesterol éster 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 o 4-aminofenazona com fenol, formando o produto quinonaimina, com absorção máxima a 520 nm. As enzimas co-imobilizadas mostraram melhor eficiência em termos de linearidade e precisão quando comparadas com a imobilização individual.

4.3 - Parte experimental

4.3.1 - Princípio do método

O método escolhido para a determinação de colesterol total (éster + livre) em soro de sangue animal baseia-se nas seguintes reações enzimáticas apresentadas na Figura 4.2:

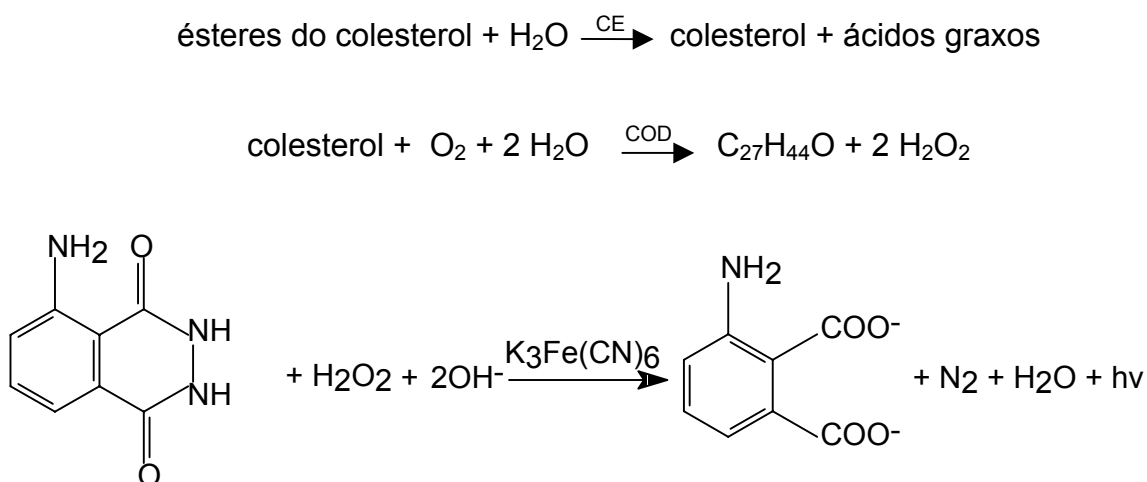


FIGURA 4.2 - Mecanismo de reação para a determinação do colesterol total em amostras de soro sanguíneo.

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 uma luminescência azul em torno de 420 nm.

4.3.2 - Materiais

4.3.2.1 - Equipamentos e acessórios

O módulo de análise foi construído empregando 4 válvulas solenóides de três vias Nresearch (161T031), tubos de polietileno com 0,8 mm de diâmetro interno empregados na confecção de linhas de transmissão, reatores helicoidais e conectores em acrílico em forma de "T". As válvulas solenóides foram controladas por um microcomputador 586, equipado com interface de controle PCL-711S da American Advantech Corp.. Uma bomba peristáltica (Ismatec, IPC-8), com velocidade variável e equipada com tubos de bombeamento de Tygon[®] de diferentes diâmetros internos, foi empregada para propulsão das soluções. Duas mini-colunas de 15 mm x 5 mm de diâmetro interno foram confeccionadas em acrílico, para o acondicionamento das esferas de vidro, contendo as enzimas imobilizadas. Para medidas dos sinais, foi empregado um espectrofotômetro Femto, modelo 700 Plus. Para a detecção quimiluminescente utilizou-se a mesma cela apresentada na Figura 3.3 do capítulo 3, apenas com distinção do volume interno. A borracha puncionométrica posicionada entre os blocos de acrílico foi substituída por um poliéster (lâmina de transparência). O programa utilizado para controle das válvulas solenóides e para a aquisição de dados foi desenvolvido em linguagem Quick BASIC 4.5.

Equipamentos complementares utilizados: sistema a vácuo para coleta de sangue animal, centrífuga Centra-7R (6000 rpm), pipetadores automáticos para micro-volumes, ponteiros de micropipetas para volumes entre 20 e 5000 μ L, tubos de ensaio com volume interno de 10 mL, suporte para tubos de ensaio, cubeta de vidro com volume interno de 4 mL, e banho com temperatura controlada FANEM[®], modelo 102.

4.3.2.2 - Reagentes e soluções

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

Solução estoque 1000 mg L^{-1} de colesterol foi preparada dissolvendo-se $0,5 \text{ g}$ de colesterol (Sigma) em uma mistura contendo $12,5 \text{ mL}$ isopropanol e $12,5 \text{ mL}$ Triton X-100. A mistura foi aquecida lentamente até $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Após a dissolução, a solução de colesterol foi diluída em 500 mL de água. Esta solução era preparada mensalmente e armazenada em frasco de polietileno, mantida sob refrigeração. Soluções de referência contendo $25, 50, 75, 100$ e 125 mg L^{-1} de colesterol foram preparadas em tampão fosfato, pH $7,5$, por diluições apropriadas da solução estoque. Estas soluções foram preparadas semanalmente e, quando não estava em uso, mantida sob refrigeração a $5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Solução $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de 5-amino-2,3-di-hidroftolazina-1,4-diona (luminol) foi preparada pela dissolução de $0,0443 \text{ g}$ do luminol em 100 mL de solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ K_2CO_3 , com pH ajustado a $10,5$ com solução de HCl. Essa solução foi armazenada em frasco âmbar e mantida sob refrigeração, quando não estava em uso.

Solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão carbonato, pH $10,5$, foi preparada dissolvendo-se $13,821 \text{ g}$ K_2CO_3 em água. O valor do pH foi ajustado com solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl e o volume completado para 500 mL .

Solução $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ foi preparada diariamente dissolvendo-se $0,4115 \text{ g}$ de sal em 25 mL de água.

Solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH $7,5$) foi preparada dissolvendo-se $13,6 \text{ g}$ de KH_2PO_4 em água. O valor do pH foi ajustado com solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH e o volume foi completado para 1000 mL .

As soluções de enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase, *Pseudomonas Fluorescens* (Sigma), foram preparadas em 3 mL de tampão fosfato pH $7,5$ contendo $1,8 \text{ mg}$ (13 U) e $11,9 \text{ mg}$ (50 U), respectivamente.

Solução 200 U enzima peroxidase, *Horseradish* (Sigma), foi preparada dissolvendo-se $1,0 \text{ mg}$ em 5 mL de tampão fosfato pH $7,5$.

Os reagentes cromogênicos foram preparados dissolvendo-se 17 mg de fenol em 25 mL de tampão tris(hidroximetil)aminometano pH $6,5$ e, 4 mg de 4-aminoantipirina em 50 mL da mesma solução de tampão. Antes do uso, as

soluções foram misturadas. Solução 150 mmol L^{-1} de tampão tris(hidroximetil)aminometano foi preparada dissolvendo-se 4,54 g em água e ajustando-se o pH a 6,5 usando $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ HCl completando o volume para 250 mL.

Um sistema enzimático, LABTEST Diagnostic (1999), catálogo número 76-2/100, para a determinação do colesterol total em amostras de soro, com reação de ponto final, foi usado para comparação dos resultados com o sistema de injeção em fluxo proposto. O *kit* comercial é composto de um único reagente contendo tampão 50 mmol L^{-1} , pH 7,0, fenol 24 mmol L^{-1} , colato de sódio $500 \mu\text{mol L}^{-1}$, azida sódica 15 mmol L^{-1} , 4-aminoantipirina $500 \mu\text{mol L}^{-1}$, colesterol esterase 250 U L^{-1} , colesterol oxidase 250 U L^{-1} e peroxidase 1000 U L^{-1} , e um padrão de 200 mg dL^{-1} contendo azida sódica 15 mmol L^{-1} . Os reagentes foram acondicionados conforme instruções anexadas ao *kit*.

4.3.3 - Imobilização enzimática

As enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase foram imobilizadas *off line* e depois acondicionadas numa mini-coluna. As enzimas foram imobilizadas, conforme MATSUMOTO et al. (1988), em esferas de vidro, porosidade de 170 Å e 200-400 mesh.

Uma quantidade de aproximadamente 0,1 g de esferas de vidro (aminopropil) foi mantida em solução de 5% (v/v) glutaraldeído, durante 2 h, sob agitação. Em seguida, as esferas de vidro foram lavadas com água e solução de tampão fosfato (pH 7,5).

As soluções de enzimas colesterol esterase (13 U) e colesterol oxidase (50 U), foram mantidas em contato com as esferas de vidro por 4 h a $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Após essa etapa, as esferas foram lavadas com água e tampão fosfato pH 7,5. Terminada a imobilização, as esferas de vidro foram acondicionadas em mini-colunas de acrílico (15 mm x 5 mm d.i.). Quando não estava em uso, as colunas enzimáticas foram mantidas em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato pH 7,5, sob refrigeração a $5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Visando a verificação da eficiência do procedimento de imobilização, experimentos foram realizados usando as soluções de enzimas colesterol esterase e oxidase, antes e após a etapa de imobilização. A eficiência da imobilização foi determinada pela adição de $200 \mu\text{L}$ de solução de enzima colesterol esterase e

colesterol oxidase, respectivamente, 200 μL de solução de enzima peroxidase, 1400 μL dos reagentes cromogênicos (700 μL fenol e 700 μL 4-aminoantipirina) e 1400 μL de 50 mg L^{-1} de solução padrão de colesterol em uma cubeta de vidro. Imediatamente após a mistura, efetuou-se a leitura de absorvância a cada 10 seg, durante 5 min, em espectrofotômetro a 500 nm. Assim, foi possível determinar quanto de solução de enzima foi imobilizada.

4.3.4 - Descrição do procedimento em fluxo

O diagrama de fluxos do módulo de análise empregado para a determinação do colesterol total em soro de sangue animal é apresentado na Figura 4.3. Para o desenvolvimento do procedimento proposto utilizou-se o sistema descrito na seção 2.3.5.1.

O sistema foi constituído por 4 válvulas solenóides que, acionadas pelo microcomputador, permitiam a inserção de alíquotas das soluções de amostras e reagentes quando necessário. Dessa forma, na posição indicada, apenas a solução transportadora (C), bombeada a 2,3 mL min^{-1} , está fluindo através do percurso analítico em direção ao detector (DET), enquanto as demais válvulas V_2 , V_3 e V_4 foram amostradas intermitentemente. Nas condições empregadas, descritas na legenda da Figura 4.3, as vazões dos reagentes (R_1) e (R_2) foram de 1,0 mL min^{-1} enquanto a vazão da amostra (A) foi de 1,2 mL min^{-1} . Para a detecção utilizou-se um espectrofotômetro convencional, onde a fonte de radiação foi bloqueada utilizando-se cela de acrílico para a detecção quimiluminescente, descrita na seção 4.3.2.1.

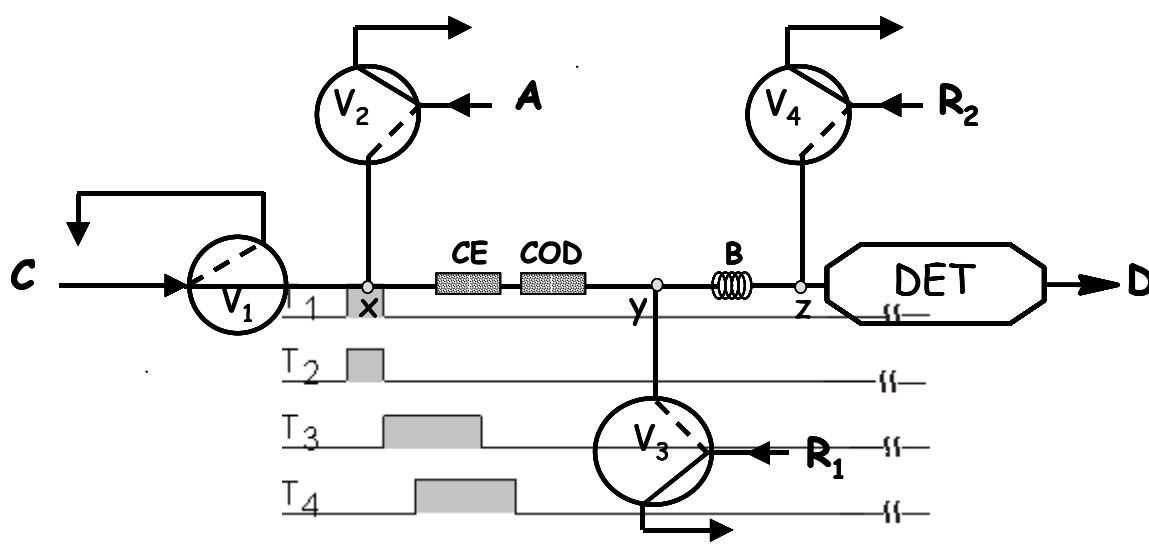


FIGURA 4.3 - Diagrama de fluxos do módulo de análise para a determinação de colesterol total. V_1 , V_2 , V_3 e V_4 - válvulas solenóides de três vias, A - amostra (vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$), C - carregador, tampão fosfato pH 7,5 (vazão de $2,3 \text{ mL min}^{-1}$), R_1 - solução de luminol, $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 10,5 (vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$), R_2 - solução de hexacianoferrato, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (vazão de $1, \text{ mL min}^{-1}$), x, y, z - pontos de confluência, CE e COD - colunas enzimáticas, B - reator tubular helicoidal (0,8 mm d.i., 50 cm), DET - detector quimiluminescente, D - descarte, linhas sólida e tracejada dentro das válvulas indicam o caminho de fluxo quando a válvula é ligada ou desligada, respectivamente. Setas indicam a direção do fluxo. T_1, T_2, T_3 e T_4 - tempo de acionamento das válvulas V_1 , V_2 , V_3 e V_4 , a superfície sombreada no diagrama de tempo de acionamento das válvulas indicam o momento em que as válvulas estão ligadas.

A partir do momento em que as válvulas V_1 e V_2 são acionadas de acordo com os diagramas de tempo T_1 e T_2 , a solução da amostra foi introduzida no percurso analítico através do ponto da confluência x, nessa etapa, o fluxo da solução transportadora foi interrompido. A solução da amostra foi conduzida em direção às colunas enzimáticas (CE e COD), onde ocorreram as reações. Após a introdução da amostra as duas válvulas V_1 e V_2 foram desligadas e a solução transportadora voltou a fluir no percurso analítico. Em seguida, foi acionada a válvula V_3 para a introdução do reagente luminol (R_1) no percurso analítico através do ponto de confluência y. Enquanto a mistura amostra (A) e reagente (R_1) foi conduzida à bobina (B), seguindo em direção ao detector (DET) para a determinação de colesterol total, foi acionada a válvula V_4 com a inserção do reagente hexacianoferrato (III) (R_2) diretamente na cela de detecção. Após a introdução dos reagentes, as válvulas foram desligadas. Fez-se a leitura dos sinais através de uma das linhas de entrada analógica da interface PCL-711S.

Empregando o sistema mostrado na Figura 4.3 foram estudados os principais parâmetros envolvidos no desenvolvimento das reações enzimáticas para a determinação de colesterol total, tais como vazões de bombeamento das soluções, comprimento do reator tubular helicoidal, volume da solução da amostra,

concentrações dos reagentes, concentração hidrogeniônica e temperatura. Os parâmetros foram estudados, inicialmente, a temperatura do ambiente (27 °C), utilizando solução de referência de 75 mg L⁻¹ de colesterol.

4.3.4.1 - Influência da vazão de bombeamento das soluções

Avaliou-se a influência da vazão da solução transportadora e dos reagentes, fixando-se a vazão de bombeamento da solução de amostra em 1,2 mL min⁻¹ e variando-se as vazões de bombeamento da solução transportadora e reagentes em 1,0; 1,2; 1,8; 2,3 e 2,6 mL min⁻¹ e 0,5; 1,0; 1,4 e 2,1 mL min⁻¹, respectivamente.

4.3.4.2 - Influência do comprimento do reator tubular helicoidal

O comprimento do reator está relacionado com o tempo de reação entre o peróxido de hidrogênio e o luminol. Para tanto, avaliou-se o comprimento do reator tubular helicoidal (B) entre 25 e 100 cm. O diâmetro interno foi mantido em 0,8 mm.

4.3.4.3 - Influência do volume da solução da amostra

O volume da amostra a ser inserido no percurso analítico através das colunas enzimáticas CE e COD, visando estabelecer a melhor interação entre o substrato e enzima, foi estudado acionando-se a válvula V₂ durante intervalos crescentes de tempo. O tempo de amostragem foi investigado variando-se o tempo de acionamento da válvula V₂ em 30, 40, 50, 55, 60, 65 e 70 s, correspondendo aos volumes de 0,6; 0,8; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3 e 1,4 mL, respectivamente.

4.3.4.4 - Influência das concentrações dos reagentes luminol e hexacianoferrato (III)

O estudo para obter as melhores concentrações dos reagentes no sistema proposto foi realizado variando-se a concentração do luminol em 0,5; 1,5; 2,5; 3,5 e 4,5 mmol L⁻¹, enquanto a concentração do reagente hexacianoferrato (III) foi avaliada em 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mol L⁻¹.

4.3.4.5 - Influência da concentração hidrogeniônica

A influência da concentração hidrogeniônica sobre o desenvolvimento das reações enzimáticas foi avaliada preparando-se a solução fosfato em pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5 observando-se a resposta do sinal analítico utilizando-se solução de referência.

4.3.4.6 - Influência da temperatura

A Influência da variação da temperatura sobre a reação enzimática foi avaliada submergindo-se as colunas CE e COD em banho de temperatura controlada. As temperaturas investigadas foram 21, 27, 37, 40 e 46 °C.

4.3.4.7 - Influência dos potenciais interferentes na determinação do colesterol total

Várias concentrações de possíveis espécies interferentes, tais como Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Na⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, uréia e ácido ascórbico, que poderiam estar presentes no sangue animal, foram adicionadas numa solução de referência de 50 mg L⁻¹ colesterol.

4.3.4.8 - Determinação de colesterol total em amostras de soro animal

A determinação de colesterol total foi realizada em 15 amostras de soro sanguíneo animal. As amostras foram inseridas em quadruplicata e, após o processamento de 5 amostras, soluções de referência eram inseridas no sistema.

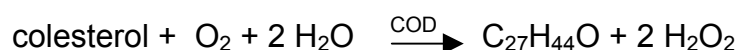
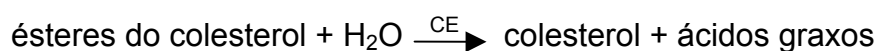
Os resultados obtidos empregando-se o sistema automatizado foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o procedimento manual de análises.

4.3.4.9 - Avaliação da estabilidade do sistema

Para avaliar a estabilidade do sistema inseriu-se, sucessivamente, alíquota de amostras durante 6 h de trabalho, e dentro deste período, em intervalos de tempo de 2 h foi inserida solução de referência de 75 mg L^{-1} de colesterol. A precisão do procedimento foi avaliada inserindo-se 20 vezes a mesma solução de referência.

4.3.5 - Procedimento manual

Para a comparação dos resultados, as amostras para a determinação de colesterol total foram analisadas empregando-se o *kit* comercial, LABTEST Diagnóstica (1999). O colesterol total foi determinado de acordo com as seguintes reações:



Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colesteno e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de

hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina, que tem absorvidade máxima em 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

Dessa forma, o preparo das soluções foi feito conforme instruções do fabricante. Em três tubos de ensaio denominados de branco, de teste e de padrão, utilizando-se micro-pipetas, transferiram-se 3 mL da solução reagente contendo tampão 50 mmol L⁻¹ pH 7,0, fenol 24 mmol L⁻¹, colato de sódio 500 μmol L⁻¹, azida sódica 15 mmol L⁻¹, 4-aminoantipirina 500 μmol L⁻¹, colesterol esterase 250 U L⁻¹, colesterol oxidase 250 U L⁻¹ e peroxidase 1000 U L⁻¹. Em seguida, adicionaram-se aos tubos de ensaio (teste e padrão) 30 μL das soluções de amostra e padrão. Para a mistura das soluções, os tubos foram agitados lentamente e transferidos em suporte para um banho com temperatura controlada a 37 °C durante 10 min. Retirou-se o suporte do banho e realizaram-se as medidas de absorvância a 510 nm, empregando-se um espectrofotômetro UV/Vis equipado com cubeta de vidro com volume interno de 4 mL.

A determinação de colesterol total em cada amostra foi realizada em triplicata, e a concentração foi calculada da forma recomendada pelo manual de instruções do *kit*:

$$\text{Colesterol (mg dL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{absorbância do teste}}{\text{absorbância do padrão}} \times 200$$

4.3.6 - Amostras

As amostras de sangue foram coletadas conforme procedimentos recomendados por CHRISTIAN (1986), JOINT FAO/IAEA PROGRAMME (1993a) e NOGUEIRA et al. (1998), cujos detalhes foram descritos no Capítulo 2 (seção 2.3.4).

O colesterol é uma biomolécula insolúvel em água e, conseqüentemente insolúvel no sangue. Para ser transportado na corrente sanguínea, o colesterol liga-se com algumas proteínas e outros lipídeos, formando um complexo chamado lipoproteína. Assim, o tratamento da amostra consistiu na precipitação das proteínas, baseado no procedimento descrito por NOGUEIRA et al.

(1998): em 1 mL de soro foram adicionados 9,0 mL de solução 10% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA), P.A., agitando-se durante 1 minuto, deixando em repouso durante 10 min. Após essa etapa, filtrou-se a solução. O precipitado foi dissolvido com uma mistura de 5 mL de isopropanol e 5 mL de Triton X-100, levado para aquecimento a 40 °C. Terminada a dissolução do precipitado, adicionou-se 5 mL de tampão fosfato pH 7,0.

Após a etapa de tratamento, as amostras foram mantidas sob refrigeração a 5 °C até a análise. O analito é estável por sete dias entre 2 e 8 °C e seis meses a -20 °C, RIFAI et al. (1997).

4.4 - Resultados e discussão

O sistema automatizado proposto para a determinação de colesterol total em soro animal foi desenvolvido também com o objetivo de potencializar sua aplicação em análises de rotina. Inicialmente, os efeitos dos parâmetros envolvidos na reação foram avaliados a temperatura do ambiente (27 °C), utilizando solução de referência de 75 mg L⁻¹ de colesterol.

Optou-se, inicialmente, por estudar as vazões das soluções. A vazão da solução transportadora foi variada em 1,0; 1,2; 1,8; 2,3 e 2,6 mL min⁻¹ e, de acordo com os resultados obtidos, foi estabelecida em 2,3 mL min⁻¹ considerando, principalmente, que vazões menores tornavam o procedimento demorado. As vazões das soluções dos reagentes luminol e hexacianoferrato (III) foram estabelecidas como 1 mL min⁻¹, respectivamente. Nessa condição, mantendo-se a proporção 1:1 entre as soluções, obtiveram-se os melhores resultados.

Uma vez estudada as vazões de bombeamento das soluções avaliou-se o comprimento do reator, pois o período de tempo disponível para o desenvolvimento da reação entre o peróxido de hidrogênio e o luminol é diretamente proporcional à dimensão do reator tubular helicoidal (B). A influência do comprimento

do reator tubular helicoidal foi estudada de maneira similar ao estudo do comprimento do reator tubular helicoidal da glicose. Assim, variou-se o comprimento do reator tubular helicoidal em 25, 50, 75 e 100 cm. Observou-se que com o aumento do comprimento do reator de 25 para 50 cm houve aumento na magnitude do sinal analítico. Contudo, quando foram utilizados os reatores de 75 e 100 cm, os sinais transientes permaneceram constantes, demonstrando que a reação entre o peróxido de hidrogênio e o luminol estava completa. Deste modo, foi selecionado o reator helicoidal com 50 cm, pois apresentou sensibilidade adequada em menor tempo.

O tempo requerido para que a amostra percolasse através das colunas enzimáticas, contendo as enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase, correspondia ao tempo disponível para promover a hidrólise do colesterol éster presente nas amostras, e a oxidação do colesterol livre. Dessa forma, quanto maior fosse o tempo de contato entre a enzima e o substrato, maior seria a eficiência de conversão, resultando em maior sensibilidade. O tempo de amostragem foi investigado variando-se o tempo de acionamento da válvula V_2 em 30, 40, 50, 55, 60, 65 e 70 s, Figura 4.4. Empregando-se esses intervalos de tempo, os volumes inseridos da solução da amostra eram de 0,6; 0,8; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3 e 1,4 mL, respectivamente. Desse estudo, foi possível avaliar que quando empregou-se o intervalo de tempo de 60 s, que correspondente ao volume de 1,2 mL, os resultados obtidos apresentaram bom compromisso entre magnitude do sinal e boa precisão das medidas.

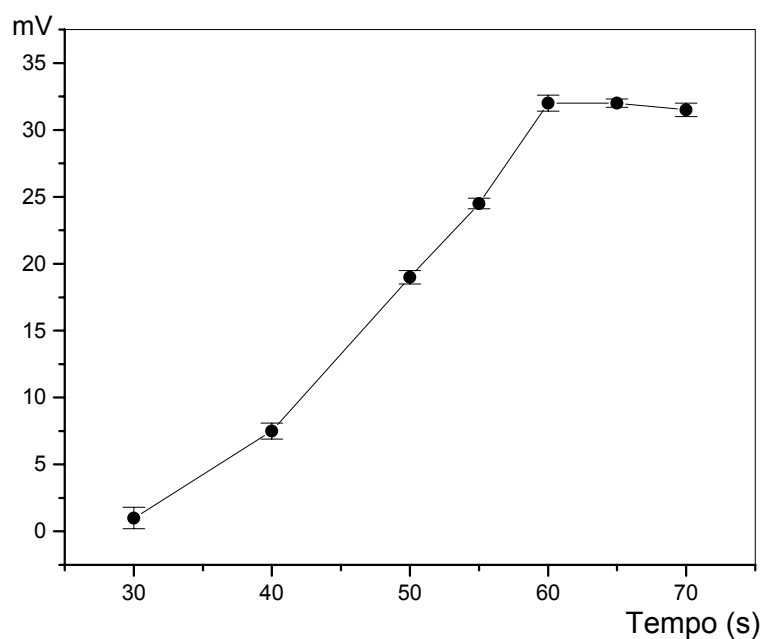


FIGURA 4.4 - Avaliação de tempo de acionamento de válvula V_2 para inserção do volume da solução de amostra, $n=3$.

Uma vez fixado o volume da solução de amostra para a determinação de colesterol total, estudou-se o intervalo de tempo para inserção do reagente luminol em 5, 10, 15, 20, 30 e 40 s (0,083; 0,166; 0,25; 0,333; 0,5 e 0,666 mL, respectivamente) e do reagente hexacianoferrato (III) em 5, 10, 15, 20 e 30 s (0,08; 0,17; 0,25; 0,33 e 0,5 mL, respectivamente), conforme Tabela 4.1. De acordo com os resultados obtidos, o intervalo de tempo de 30 e 10 s foram selecionados para a inserção da solução de luminol e da solução de hexacianoferrato (III), respectivamente. Nessa condição, observou-se melhor linearidade dos sinais.

TABELA 4.1 - Influência dos volumes dos reagentes R_1 e R_2 sobre o sinal analítico.

Válvula acionada (V_3)		Válvula acionada (V_4)		Sinal
Tempo	Volume	Tempo	Volume	

(s)	(μL)	(s)	(μL)	(mV)
5	83	10	166	20
10	166	10	166	30
15	250	10	166	35
20	333	10	166	50
30	500	10	166	65
40	666	10	166	45
30	500	5	83	40
30	500	15	250	50
30	500	20	333	45
30	500	30	500	40

Volumes inseridos pelas válvulas V_3 e V_4 correspondem às soluções de luminol e de hexacianoferrato (III), respectivamente

Uma vez estabelecidas as melhores condições de volume das soluções das amostras e reagentes para a determinação de colesterol total, foram estudadas as concentrações dos reagentes.

Para o estudo da concentração do reagente luminol empregaram-se soluções contendo 0,5; 1,5; 2,5; 3,5 e 4,5 mmol L^{-1} , respectivamente. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.5, onde pode-se observar que o sinal máximo foi obtido com solução de 2,5 mmol L^{-1} de luminol. Com isso, optou-se em manter essa solução para os próximos estudos.

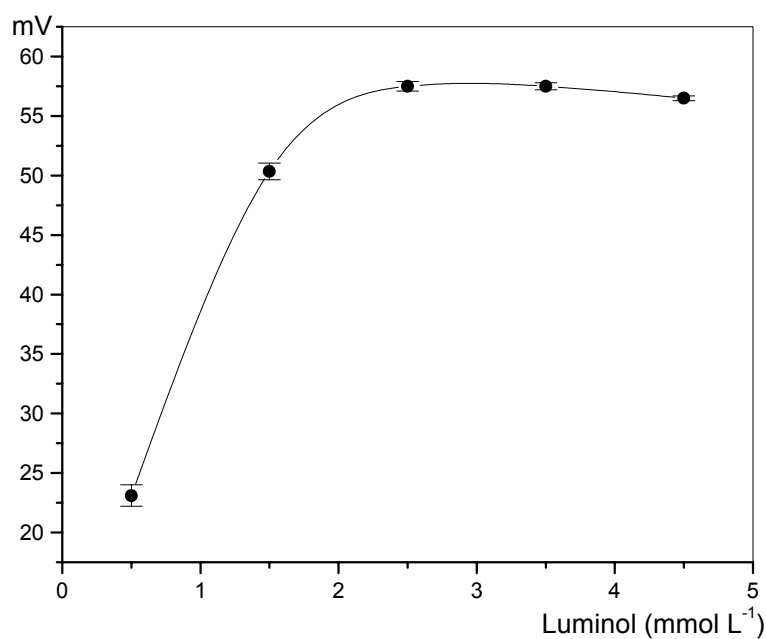


FIGURA 4.5 - Influência da concentração do luminol sobre a intensidade quimiluminescente, $n=3$.

Experimentos similares foram executados para verificar a influência da concentração de hexacianoferrato (III) no processo envolvido. Para isso, a concentração do reagente foi variada entre 0,01 e 0,4 mol L⁻¹. Os resultados são mostrados na Figura 4.6, e como pode ser visto, a condição ótima para a concentração da solução de hexacianoferrato (III) foi obtida quando empregou-se a solução 0,05 mol L⁻¹.

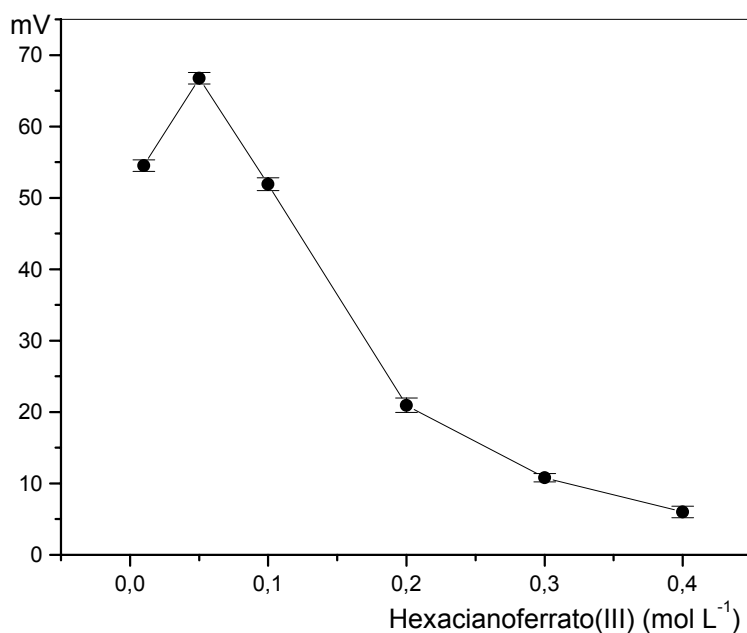


FIGURA 4.6 - Influência da concentração do hexacianoferrato (III) sobre a intensidade quimiluminescente, n=3.

Excluídas algumas exceções, o pH ótimo para as reações enzimáticas situa-se próximo à neutralidade (com desvio padrão de 2 unidades de pH), RICARDO e TEIXEIRA (1993). Assim, realizou-se um estudo variando-se o pH final da solução transportadora em 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5. Pode-se observar na Figura 4.7 que o sinal aumentou gradativamente até o pH 7,5 e diminuiu à medida que a solução ficava mais alcalina. Esse efeito, provavelmente, ocorreu devido à desnaturação das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase em pH mais alcalino. Considerando-se esses resultados, fixou-se o pH da solução transportadora em 7,5.

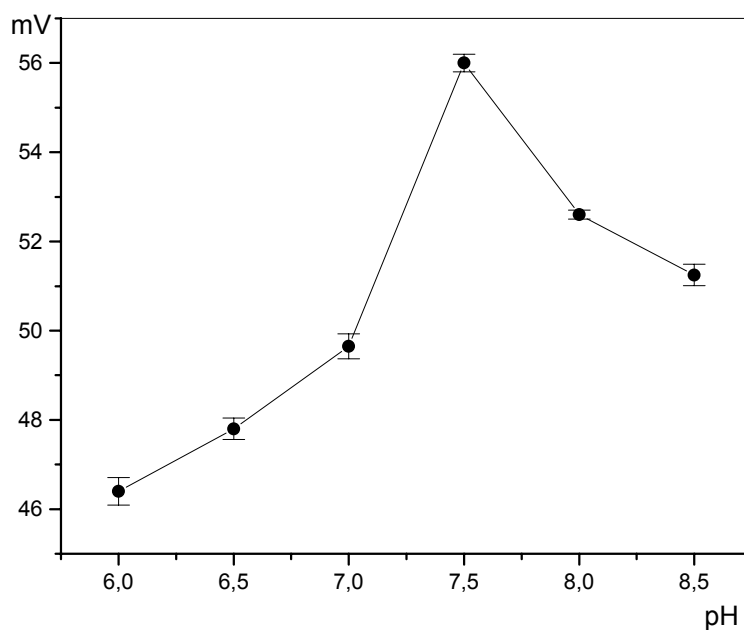


FIGURA 4.7 - Influência da concentração hidrogeniônica sobre as reações enzimáticas, n=3.

Outro estudo realizado foi a influência da temperatura na reação enzimática. Com o aumento contínuo da temperatura, as enzimas tendem a uma inativação gradativa até a desnaturação. Caso o tempo de atuação da temperatura não seja prolongado, a enzima poderá recuperar a configuração inicial (renaturação), quando o agente desnaturante for eliminado, RICARDO e TEIXEIRA (1993). A temperatura do meio reacional foi variada entre 21 e 46 °C, empregando-se um banho com temperatura controlada. Os resultados podem ser verificados na Figura 4.8. O melhor resultado foi obtido quando empregou-se uma temperatura a 27 °C (temperatura do ambiente), onde as atividades das enzimas colesterol esterase e oxidase eram máximas. Para o melhor desenvolvimento das reações, a temperatura foi fixada a 27 °C.

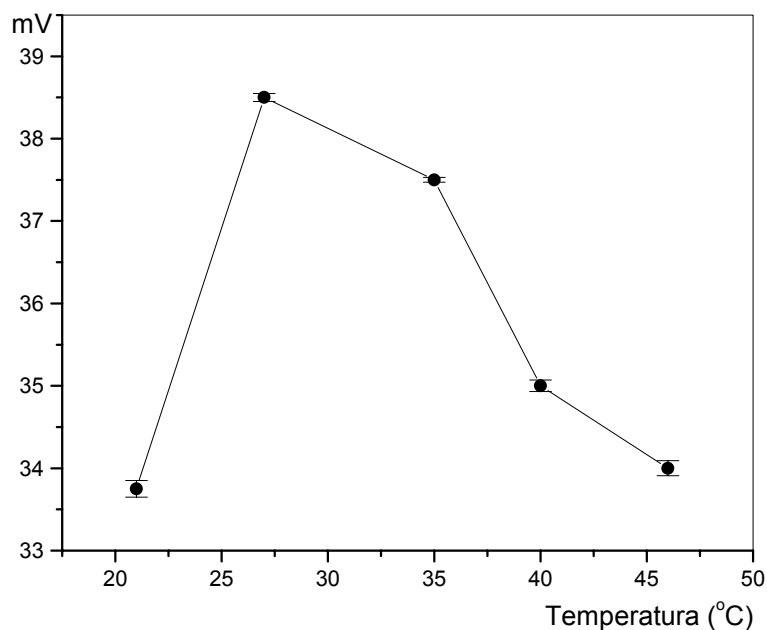


FIGURA 4.8 - Influência da temperatura sobre as reações enzimáticas, n=3.

Posteriormente, avaliou-se a possível interferência causada por alguns componentes presentes nas amostras de soro. Para isso, soluções de diferentes concentrações de Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , uréia e ácido ascórbico foram adicionadas à solução de referência de 50 mg L^{-1} de colesterol, e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.2.

No estudo de interferentes realizados neste trabalho, os íons Zn^{2+} e Cu^{2+} apresentaram interferência negativa (cerca de 15%). Contudo, esses elementos não interferiram nas medidas quando empregando amostras reais, pois não foram observados erros significativos na determinação do colesterol quando comparado aos resultados obtidos com o procedimento manual (*kit*).

TABELA 4.2 - Influência dos possíveis potenciais interferentes na determinação do colesterol total.

Espécies químicas	Adicionado (mg L ⁻¹)	Colesterol (mg L ⁻¹)	Sinal (mV)	Erro (%)
-	-	50	74 ± 2	-
Ca ²⁺	20	50	69 ± 2	-6
Zn ²⁺	0,01	50	62 ± 1	-15
Cu ²⁺	0,01	50	65 ± 2	-12
K ⁺	100	50	74 ± 1	0
Na ⁺	1000	50	74 ± 1	0
Mg ²⁺	20	50	72 ± 1	-2
Fe ²⁺	0,005	50	75 ± 2	+2
uréia	100	50	70 ± 1	-4
ácido ascórbico	0,02	50	74 ± 2	0

Resultados representam médias e desvio padrão estimados a partir de 3 replicatas

Realizaram-se experimentos para avaliar a eficiência do procedimento de imobilização, usando soluções de enzima colesterol esterase e colesterol oxidase, antes e após a etapa da imobilização. Desse modo, após as medidas de absorvâncias das soluções das enzimas, monitoradas no espectrofotômetro UV-Vis, obteve-se eficiência de 75% e 92% de imobilização da enzima colesterol esterase e colesterol oxidase, respectivamente.

Na Figura 4.9 pode ser observado o registro dos sinais transientes com boa repetibilidade dos sinais obtidos para soluções de referências de colesterol entre 25 e 125 mg L⁻¹.

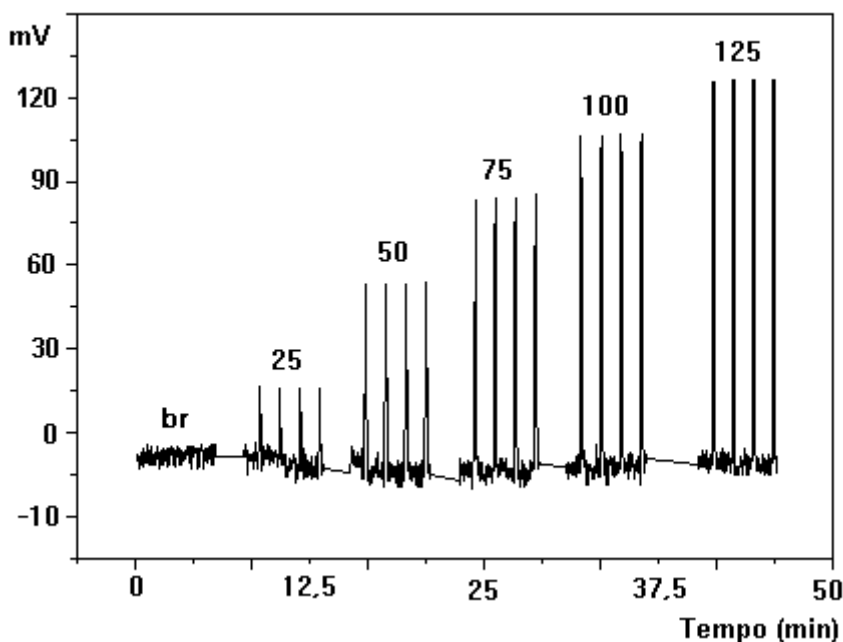


FIGURA 4.9 - Registro dos sinais transientes referente à determinação de colesterol com soluções de referências entre 25 e 125 mg L⁻¹ de colesterol.

Para a construção da curva analítica de colesterol foram fixados os seguintes parâmetros: solução transportadora 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato pH 7,5, concentração dos reagentes luminol e hexacianoferrato (III) de 2,5 mmol L⁻¹ e 0,05 mol L⁻¹, respectivamente, temperatura da reação enzimática de 27 °C e comprimento do reator tubular helicoidal de 50 cm. A Figura 4.10 ilustra a curva analítica do colesterol com resposta linear entre 25 e 125 mg L⁻¹, descrita pela equação: $y = 0,448 + 0,986 x$ ($r = 0,998$), sendo y = absorbância e x = concentração.

Outras características analíticas foram obtidas, tais como frequência de amostragem de 40 determinações por hora, limite de detecção de 3,7 mg L⁻¹ de colesterol, em nível de confiança de 99,7%, e desvio padrão relativo de 2,3% estimados através de 20 replicatas. O consumo de reagentes foi de 0,22 mg de luminol e 2,75 mg de hexacianoferrato (III) por determinação de colesterol.

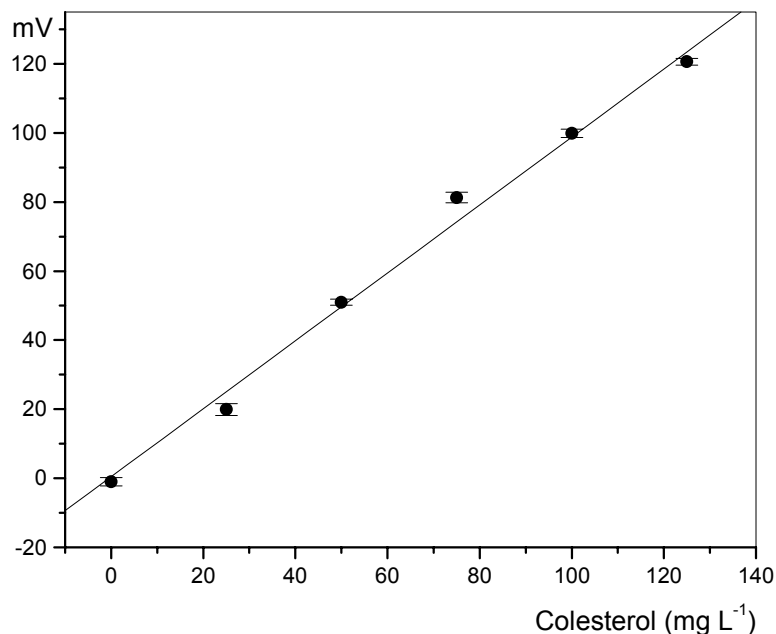


FIGURA 4.10 - Curva analítica de colesterol. Condições: solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato pH 7,5, solução de luminol 2,5 mmol L⁻¹, solução de hexacianoferrato (III) 0,05 mol L⁻¹, reatores tubulares helicoidais de 50 cm e temperatura de 27 °C ($y = 0,448 + 0,986 x$, $r = 0,998$).

O procedimento proposto foi aplicado à determinação de colesterol em soro sanguíneo animal. Os resultados, mostrados na Tabela 4.3, foram concordantes com os obtidos pelo método manual (*kit* LABTEST). Aplicando-se o teste *t*, não foi observada diferença significativa entre os resultados em nível de 95% de confiança, HARRIS (1995).

TABELA 4.3 - Resultados obtidos na determinação de colesterol total em amostras de soro ovino e bovino empregando o sistema proposto e o procedimento manual.

Amostra	Sistema proposto ^a (mg L ⁻¹)	Kit-LABTEST ^b (mg L ⁻¹)
ovino	462 ± 7	460 ± 1
ovino	869 ± 3	873 ± 4
ovino	682 ± 4	670 ± 7
ovino	650 ± 1	644 ± 5
ovino	670 ± 8	675 ± 6
bovino	625 ± 6	630 ± 6
bovino	812 ± 4	807 ± 4
bovino	1093 ± 9	1088 ± 5
bovino	735 ± 3	733 ± 2
bovino	789 ± 2	794 ± 6

^a Resultados representam média ± desvio padrão, n=4

^b Resultados representam média ± desvio padrão, n=3

Após a comparação do método, avaliou-se a estabilidade do sistema para um dia de trabalho introduzindo-se alíquotas das amostras por 6 h e, a cada 2 h, solução de referência contendo 75 mg L⁻¹ de colesterol. Pode-se observar que o sistema apresentou boa estabilidade, não sendo observadas variações nos sinais transientes. Realizaram-se 600 determinações com as colunas enzimáticas, apresentando um decréscimo de 30% na magnitude dos sinais.

Na tabela 4.4 são apresentados alguns parâmetros para comparação entre os procedimentos proposto e manual. Com o sistema proposto empregando multicomutação obteve-se uma redução de volumes das soluções de reagentes e, conseqüentemente, da geração de efluentes. Outra vantagem do sistema proposto foi o emprego da detecção quimiluminescente sendo possível eliminar o uso do reagente fenol utilizado no procedimento espectrofotométrico (*kit*). A frequência de amostragem foi de 40 determinações por hora. Para o procedimento manual, a frequência de amostragem depende da habilidade do analista, nesse caso, obteve-se frequência de 15 determinações por hora. A manipulação das amostras foi

minimizada com o procedimento proposto, evitando, assim, possíveis contaminações. O custo por determinação de amostra foi calculado considerando-se os preços das soluções de reagentes usados, desprezando, no caso, o custo de equipamentos e a mão de obra do analista por hora trabalhada. Observa-se pequena diferença no custo, porém, deve-se ser salientadas as vantagens obtidas pelo procedimento proposto.

TABELA 4.4 - Comparação entre o procedimento proposto e o procedimento manual.

Parâmetros	Procedimentos	
	Proposto	Manual
Volume de amostra	1200 μL	30 μL
Consumo de reagentes	500 e 170 μL	9000 μL
Efluente gerado	2600 μL	9060 μL
Frequência de amostragem	40 det./h	?
Manuseio da amostra	<	>
Custo por determinação	R\$ 1,40	R\$ 1,50

4.5 - Conclusões

O método proposto para a determinação de colesterol total mostrou-se adequado para o grupo de amostras estudado, apresentando boa sensibilidade, precisão e velocidade analítica, apresentando compatibilidade com os métodos propostos para este fim. O emprego da multicomutação tornou-se importante, devido à redução de volumes de soluções de reagentes gastos e geração de efluentes quando comparados com o procedimento manual. O sistema propiciou vantagens tais como a simplicidade do equipamento utilizado, além de um número maior de determinações por hora e menor manuseio da amostra.

A coluna enzimática apresentou uma boa estabilidade e durabilidade, fator esse importante para a determinação de colesterol total.

Para aplicação em larga escala, este sistema será de grande interesse, pois evitará trabalhos tediosos para o analista e, ainda, possibilitará para o mesmo a dedicação à outras atividades laboratoriais durante o processamento das amostras.

CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os sistemas FIA, implementados com o conceito de multicomutação, possibilitam a determinação de importantes constituintes bioquímicos encontrados no sangue animal e, assim, auxiliam na investigação das possíveis relações entre alimentação, constituintes sanguíneos e desempenho animal. Desse modo, obtém-se o monitoramento rápido do estado nutricional do animal, o que auxilia na prevenção de desequilíbrios causados por superdosagens ou deficiências nutritivas.

Para todas as aplicações propostas houve uma diminuição considerável no consumo de reagentes, quando comparadas aos procedimentos em batelada, onde a adição dos reagentes é feita de modo contínuo. Isso foi relevante para a redução de custos e, principalmente, para os volumes de efluentes gerados.

Com relação à facilidade operacional dos sistemas propostos, estes são facilmente montados e operados. A montagem do módulo de análises requer conhecimento de eletrônica, informática, além de conhecimentos prévios em análise em fluxo, informações estas que podem ser obtidas em laboratórios especializados em análises em fluxo. Uma vez montado, os sistemas são facilmente operados e a relação custo/benefício justifica a aplicação de tais métodos.

Os sistemas desenvolvidos apresentaram excelente desempenho e estabilidade, inclusive a coluna enzimática, sendo recomendados para laboratórios que utilizam procedimentos manuais de análises para as determinações de parâmetros metabólicos no sangue.

Os resultados alcançados com os sistemas propostos descritos nos capítulos anteriores demonstraram, mais uma vez, que os procedimentos empregando sistemas FIA são excelentes alternativas para automatização de métodos analíticos. De acordo com os resultados obtidos, nas determinações de 3-hidroxiacetato, glicose e colesterol, pode-se concluir que os três procedimentos apresentaram menor consumo de reagentes, redução na quantidade de efluentes gerados, menor manipulação das amostras, conseqüentemente, menor risco de contaminação, maior rapidez na emissão dos resultados e melhor precisão nas medidas quando comparados com os métodos manuais de análises. Desse modo, as características analíticas obtidas: precisão, exatidão, robustez e freqüência de

amostragem mostraram que é viável o emprego dos sistemas propostos em análises de rotina.

É importante ressaltar que os procedimentos propostos permitem a adaptação de outras metodologias, utilizando-se detecção quimiluminescente para a determinação de outros parâmetros metabólicos de interesse na nutrição animal com o mesmo módulo de análise. Assim, esperam-se as mesmas vantagens observadas nos procedimentos desenvolvidos neste trabalho.

Em continuidade aos trabalhos propostos, sugere-se a determinação seqüencial de 3-hidroxiacetato, glicose e colesterol empregando-se o acoplamento dos três sistemas em um único módulo de análise, como apresentado na Figura 5.1.

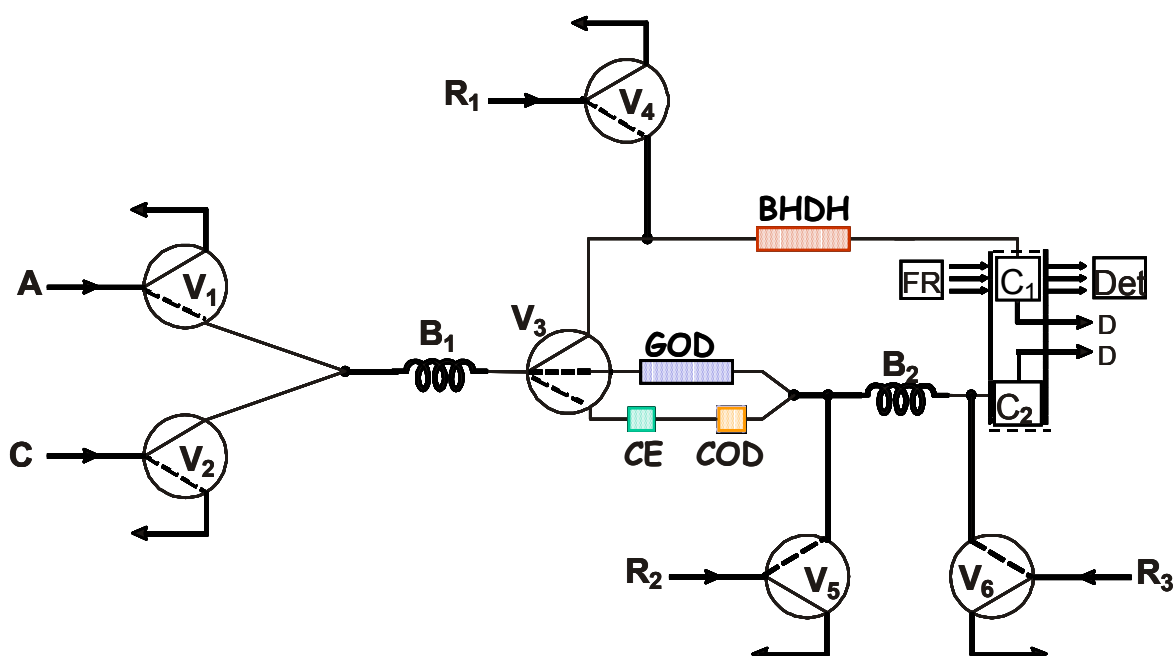


FIGURA 5.1 - Módulo de análise para a determinação seqüencial de 3-hidroxiacetato, glicose e colesterol. V₁, V₂, V₄, V₅ e V₆ - válvulas solenóides de três vias, V₃ - válvula solenóide de quatro vias, A - amostra, C - carregador, R₁ - solução de NAD⁺, R₂ - solução de luminol, R₃ - solução de hexacianoferrato (III), B₁ e B₂ - reatores tubulares helicoidais, GOD - glicose oxidase, CE - colesterol esterase, COD - colesterol oxidase, FR - fonte de radiação, C₁ e C₂ - cela de detecção espectrofotométrica e quimiluminescente, respectivamente, Det - detector.

Sugere-se também que a determinação do 3-hidroxiacetil-CoA seja realizada por detecção quimiluminescente, assim, seria possível a implementação dos três procedimentos com um único modo de detecção. Entretanto, é necessária a adição de mais uma enzima, NADH oxidase, no desenvolvimento da reação para a formação do peróxido de hidrogênio.

Outra implicação para a determinação de colesterol total em amostras de soro sanguíneo animal, está no desenvolvimento em linha do tratamento da amostra, contribuindo para a minimização da contaminação e tempo de preparo das amostras, além do fornecimento de resultados em menor tempo.

CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, A. L.; GENNARI, S. M.; VITTI, D. M.S.S.; MEIRELLES, C. F. & TAKAHASHI, S. "Some nutritional and metabolic aspects of calves maintained under two different dietary protein and experimentally infected with *haemonchus placei*". *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.*, **33**: 295, 1996.

ALBERTIN, R.; ARRIBAS, M. A. G.; BASTOS, E. L.; ROPKE, 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.

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.

AMARAL, A. S.; GASPAR, L. F. J.; HENNEMANN, C. R. A. "Valores de referência de constituintes bioquímicos séricos para cães da região de Santa Maria, RS". *Rer. Fac. Zotec. Vet. Agro. Uruguaiana*, **2/3**: 81, 1995/1996.

ANCLIVEPA/SP, URL <http://www.anclivepa-sp.org.br/rev-6-25-01.htm>, 2003.

ARAÚJO, A. N.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, B. F. & ZAGATTO, E. A. G.; "Multicommutation in flow analysis. Part 3. Spectrophotometric kinetic determination of creatinine in urine exploiting a novel zone sampling approach". *Anal. Chim. Acta*, **310**: 447, 1995.

BAUM, S. J. *Introduction to Organic and Biological Chemistry*. 2a ed. New York, Macmillan Publishing Co., 1978, p.330

BELL, A. W. "Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation". *J. Anim. Sci.*, **73**: 2804, 1995.

BLUNT, M. H. *The Blood of Sheep. Composition and Function*. New York, Springer-Verlag, 1977. 226 p.

BOSTICK, D. T. & HERCULES, D. M. "Quantitative determination of blood glucose using enzyme induced chemiluminescence of luminol". *Anal. Chem.*, **47**: 447, 1975.

BRACO, L.; DABULIS, K.; KLIBANOV, A. M. "Production of abiotic receptors by molecular imprinting of proteins". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 274, 1990.

BRUNNER, L. A. "The laboratory of the 1990s - Planning for total automation". *J. Autom. Chem.*, **14**: 43, 1992.

CALATAYUD, J. M. *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals: Automation in the Laboratory*. Taylor & Francis, 1996, 394p.

CALVO, E. J. & DANILOWICZ, C. "Amperometric enzyme electrodes". *J. Braz. Chem. Soc.*, **8**: 563, 1997.

CAMPANELLA, L.; PYRZYNSKA, K. & TROJANOWICZ, M. "Chemical speciation by flow-injection analysis. A review". *Talanta*, **43**: 825, 1996.

CARBOIDRATOS/METABOLISMO, URL http://geocities.com/bioquimica_2000/Metabolismo.html, 2003.

CHASSAGNE, M. & BARNOUIN, J. "Circulating PgF₂ α and nutritional parameters at parturition in dairy cows with and without retained placenta: relation to prepartum diet". *Theriogenology*, **38**: 407, 1992.

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.

CHRISTIAN, G. D. *Analytical Chemistry*. 4a ed. New York, John Wiley & Sons, 1986. 676p.

COLES, E. H. *Veterinary Clinical Pathology*. 3a ed. Philadelphia, W. B. Saunders, 1980, 562 p.

CONTRERAS, P. A., WITTEWER, F., BOHMWALD, H. "Uso dos perfis metabólicos no monitoramento nutricional dos ovinos". IN: *Perfil Metabólico em Ruminantes: seu Uso em Nutrição e Doenças Nutricionais*. GONZÁLEZ, F. H. D., BARCELLOS, J. O., OSPINA, H., RIBEIRO, L. A. O. Porto Alegre: UFRGS, 2000. p. 14-15.

CROOK, M. "Robotics: Past, present and future". *Anal. Proc.*, **22**: 165, 1993.

CUSTER, E. M.; MYERS, J. L.; POFFENBARGER, P. L.; SCHOEN, I. "The storage stability of 3-hydroxybutyrate in serum, plasma, and whole blood". *Am. J. Clin. Pathol.*, **80**: 375, 1983.

DODEIGNE, C.; THUNUS, L. & LEJEUNE, R. "Chemiluminescence as diagnostic tool. A review". *Talanta*, **51**: 415, 2000.

DRACKLEY, J. K. *Transitional Period Nutrition Management Explored. Feedstuffs*. USA, 1998a. p.12

DRACKLEY, J. K. "Nutrition management of dairy cows during the transition period". *Annual Ruminant Nutrition Symposium*. Flórida – EUA, 1998b.

EKMAN, L. "Variation of some blood biochemical characteristics in cattle, horses and dogs, and causes of such variations". *Ann. Rech. Véter.*, **7**: 125, 1976.

EMERY, R. S.; BURG, N.; BROWN, L. D.; BLANK, G. N. "Detection, occurrence and prophylactic treatment of borderline ketosis with propylene glycol feeding". *J. Dairy Sci.*, **47**: 1074, 1964.

FATIBELLO-FILHO, O. & CAPELATO, M. D. "Biossensores". *Quim. Nova*, **15**: 28, 1992.

FENNER, W. R. *Manual de Prática Clínica Veterinária*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1985, p.371

FERGUSON, J. D. & CHALUPA, W. "Impacto of protein nutrition on reproduction in dairy cows". *J. Dairy Sci.*, **72**: 746, 1989.

GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; BAEYENS, W. R. G.; ZHANG, X.; ALÉS, F. & GÁMIZ, L. "Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo". *Ars Pharmaceutica*, 42(1): 81, 2001.

GOFF, J. P. & HORST, R. L. "Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders". *J. Dairy Sci.*, **80**: 1260, 1997.

GONZÁLEZ, F. H. D. "Uso do perfil metabólico no diagnóstico de doenças metabólico-nutricionais em ruminantes". IN: *Perfil Metabólico em Ruminantes: seu Uso em Nutrição e Doenças Nutricionais*. GONZÁLEZ, F. H. D., BARCELLOS, J. O., OSPINA, H., RIBEIRO, L. A. O. Porto Alegre: UFRGS, 2000. p. 18.

GORTON, L. & BHATTI, K. M. "Potentiometric determination of glucose by enzymatic oxidation in a flow system". *Anal. Chim. Acta*, **105**: 43, 1979.

GORTON, L. & OGREN, L. "Flow injection analysis for glucose and urea with enzyme reactors and on-line dialysis". *Anal. Chim. Acta*, **130**: 45, 1981.

GRAHAM, L. P. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. Oxford, Oxford University Press, 1995. p.27

GRUMMER, R. R. "Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow". *J. Anim. Sci.*, **73**: 2820, 1995.

GUIA ONLINE DE CLÍNICA BUIÁTRICA, URL <http://www.mgar.vet.br/guiaonline/aspnervoso.asp>, 2003.

GUILBAULT, G. G. & HJELN, M. "Nomenclature for automated and mechanized analysis". *Pure Appl. Chem.*, **61**: 1657, 1989.

HAHN, Y.; OLSON, C. L. "Amperometric enzymatic determination of total cholesterol in human serum with tubular carbon electrodes". *Anal. Chem.*, **51**: 443, 1979.

HARRIS, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. New York, W. H. Freeman and Company, 1995, p.62

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.

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.

HUANG, Y.; ZHANG, C.; ZHANG, Z. "Chemiluminescence flow biosensor system for cholesterol with immobilized reagents". *Anal. Sci.*, **15**: 867, 1999.

ISACSSON, U. & WETTERMARK, G. "Chemiluminescence in analytical chemistry". *Anal. Chim. Acta*, **68**: 339, 1974.

ISHIDA, J.; TAKADA, M.; HARA, S.; SASAMOTO, K.; KINA, K. & YAMAGUCHI, M. "Development of a novel chemiluminescent probe, 4-(5', 6'-dimethoxybenzothiazolyl)phthalhydrazide". *Anal. Chim. Acta*, **309**: 211, 1995.

JARDIM, W. R. *Alimentos e Alimentação do Gado Bovino*. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres Ltda, 1976, 338p.

JOINT FAO/IAEA PROGRAMME. *Animal Production and Health: Nutricional Metabolite Kit Protocols*. Seibersdorf, Agency's Laboratories, 1993a.

JOINT FAO/IAEA PROGRAMME. *Animal Production and Health: β -Hydroxybutyrate Kit Protocols*. Seibersdorf, Agency's Laboratories, 1993b.

KAITHO, R. J.; UMUNNA, N. N.; NSAHLAI, I. V.; TAMMINGA, S.; VAN BRUCHEM, J. "Utilization of browse supplements with varying tannin levels by Ethiopian Menz sheep - 1. Intake, digestibility and live weight changes". *Agroforest. Syst.*, **39**: 145, 1997.

KANEKO, J. J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 4ed. San Diego: Academic Press, 1989, 932 p.

KIBA, N.; KOEMADO, H.; FURUSAWA, M. "Flow-injection determination of 3-hydroxybutyrate in serum with an immobilized 3-hydroxybutyrate dehydrogenase reactor and fluorescence detection". *Talanta*, **41**: 1583, 1994a.

KIBA, N.; KOEMADO, H.; FURUSAWA, M. "Determination of 3-hydroxybutyrate in serum by flow-injection analysis using a co-immobilized 3-hydroxybutyrate dehydrogenase NADH oxidase reactor and a chemiluminometer". *Anal. Chim. Acta*, **298**: 129, 1994b.

KIBA, N.; KOEMADO, H.; FURUSAWA, M. "Flow-injection method for the simultaneous determination of D- glucose and 3-hydroxybutyrate with co-immobilized enzyme reactors and a chemiluminometer". *Anal. Sci.*, **11**: 605, 1995.

KIBA, N.; SAEGUSA, K.; FURUSAWA, M. "Post-column enzyme reactors for chemiluminometric detection of glucose, 1,5-anhydroglucitol and 3-hydroxybutyrate in an anion-exchange chromatographic system". *J. Chromatogr. B*, **689**: 393, 1997.

KINGSTON, H. M. & KINGSTON, M. L. "Nomenclature in laboratory robotics and automation". *J. Autom. Chem.*, **16**: 43, 1994.

KOUNDAKJIAN, P. P.; SNOSWELL, A. M. "Ketone body and fatty acid metabolism in sheep tissues". *Biochem. J.*, **119**: 49, 1970.

KRICKA, L. J. & THORPE, G. H. G. "Chemiluminescent and bioluminescent methods in analytical chemistry – A review". *Analyst*, **108**: 1274, 1983.

KRICKA, L. J. "Chemiluminescence and bioluminescence." *Anal. Chem.*, 65(12): 460R, 1993.

KRONKA, E. A. M.; REIS, B. F.; KORN, M. & BERGAMIN FILHO, H. "Multicommutation in flow analysis. Part 5. Binary sampling for sequential spectrophotometric determination of ammonium and phosphate in plant digests". *Anal. Chim. Acta*, **334**: 287, 1996.

KRONKA, E. A. M.; REIS, B. F.; VIEIRA, J. A.; BLANCO, T. & GERVASIO, A. P.G. "Multicommutação e amostragem binária em análise química em fluxo. Determinação espectrofotométrica de ortofosfato em águas naturais". *Quim. Nova*, 20(4): 372, 1997.

KRONKA, E. A. M.; PAIM, A. P. S.; REIS, B. F.; LIMA, J. L. F. & LAPA, R. A. "Determination of glucose in soft drink and sugar-cane juice employing a multicommutation approach in flow system and enzymatic reaction". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **364**: 358, 1999.

KRUG, F. J.; BERGAMIN FILHO, H. & ZAGATTO, E. A. G. "Commutation in flow injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, **179**: 103, 1986.

KRUG, A.; GOBEL, R.; KELLNER, R. "Flow-injection analysis for total cholesterol with photometric detection". *Anal. Chim. Acta*, **287**: 59, 1994.

LABTEST Diagnóstica. *Colesterol Liquiform*, cat. 76-2/100, MG – BR. 1999.

LABTEST Diagnóstica. *Glicose PAP Liquiform*, cat. 84-2/250, MG – BR. 2000.

LAESPADA, M. E. F.; PAVÓN, J. L. P.; CORDERO, B. M. "Electroluminescent detection of enzymatically generated hydrogen peroxide". *Anal. Chim. Acta*, **327**: 253, 1996.

LEAN, I. J.; BRUSS, M. L.; BALDWIN, R. L.; TROUTT, H. F. "Bovine ketosis: A review. 1. Epidemiology and pathogenesis". *Vet. Bull.*, **61**: 1209, 1991.

LEHNINGER, A. L. *Princípios da Bioquímica*. 2a ed. São Paulo, Savier, 1986. p.154.

LI, P. K.; LEE, J. T.; MACGILLIVRAY, M. H.; SCHAEFER, P. A.; SIEGEL, J. H. "Direct fixed-time kinetic assays for 3-hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyzer or a computer-backed spectrophotometer". *Clin. Chem.*, **26**: 1713, 1980.

LUCAS, G. C. & REIS, B. F. "Sistema em fluxo para determinação espectrofotométrica de uréia em plasma de sangue animal empregando leguminosa como fonte natural da enzima urease". *Quim. Nova*, 24(2): 191, 2001.

LUQUE DE CASTRO, M. D. & VALCÁRCEL, M. "Simultaneous determinations in flow injection analysis. A review". *Analyst*, **109**: 413, 1984.

LUQUE DE CASTRO, M. D. "Speciation studies by flow-injection analysis". *Talanta*, **33**: 45, 1986.

LV, Y.; ZHANG, Z.; CHEN, F. "Chemiluminescence microfluidic system sensor on a chip for determination of glucose in human serum with immobilized reagents". *Talanta*, **59**: 571, 2003.

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.

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.

MALLARD, B. A.; DEKKERS, J. C.; IRELAND, M. J.; LESLIE, K. E.; SHARIF, S.; LACEY VANKAMPEN, C.; WAGTER, L. & WILKIE, B. N. "Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health". *J. Dairy Sci.*, **81**: 585, 1998.

MARKO-VARGA, G. & DOMÍNGUEZ, E. "Enzymes as analytical tools". *Trends Anal. Chem.*, **10**(9): 290, 1991.

MARQUES, D. C.; MARQUES Jr, A. P.; FERREIRA, P. M. & FONSECA, V. O. *Criação de Bovinos*. 4a ed. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Editor Dorcimar, 1981. 479p.

MARSHALL, S. M.; ALBERTI, K. G. M. M. *The Diabetes Annual*. Amsterdam, Elsevier, 1987, p. 489

MARTELLI, P. B.; REIS, B. F.; KRONKA, E. A. M.; BERGAMIN FILHO, H.; KORN, M.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C. & ARAÚJO, 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.

MARTELLI, P. B. *Titulação Potenciométrica Automática por Procura Binária em Sistemas de Análise em Fluxo Utilizando Eletrodo Tubular Sensível ao Íon Hidrogênio*. São Carlos, Universidade de São Paulo, 1997. Tese de doutorado, 148p.

MARTELLI, P. B.; REIS, B. F.; ARAÚJO, A. N. & MONTENEGRO, M. C. B. S. M. "A flow system with a conventional spectrophotometer for the chemiluminescent determination of lactic acid in yoghurt". *Talanta*, **54**: 879, 2001.

MATSUMOTO K.; KAMIKADO H.; MATSUBARA H.; OSAJIMA Y. "Simultaneous determination of glucose, fructose, and sucrose in mixtures by amperometric flow injection analysis with immobilized enzyme reactors." *Anal. Chem.*, **60**:147, 1988.

McNAMARA, D. J. "Dietary cholesterol and atherosclerosis". *Biochim. Biophys. Acta.*, **1529**: 310, 2000.

McNEIL, C. J.; SPOORS, J. A.; COOPER, J. M.; ALBERTI, K. G. M. M.; MULLEN, W. H. "Amperometric biosensor for rapid measurement of 3-hydroxybutyrate in undiluted whole blood and plasma". *Anal. Chim. Acta*, **237**: 99, 1990.

MESTRE, Y. F & ZAMORA, L. L. "Determination of phenylephrine hydrochloride by flow injection analysis with chemiluminescence detection". *J. AOAC Int.*, 84(1): 13, 2001.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. *Veterinary Laboratory Medicine*. Philadelphia, W. B. Saunders, 1992, p. 55

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.

MILLER, J. C.; MILLER, J. N. *Statistics for Analytical Chemistry*. Ellis Horwood, Chichester, 1988, p. 55

MIN, R. W.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. "On-line monitoring of glucose and penicillin by sequential injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, **320**: 199, 1996.

NABI, A.; RASHID, A.; YAQOOB, M. "Chemiluminescent determination of cholesterol by flow injection analysis with immobilized cholesterol oxidase". *Anal. Lett.*, **29**: 2281, 1996.

NAKASHIMA, K.; HAYASHIDA, N.; KAWAGUCHI, S.; AKIYAMA, S.; TSUKAMOTO, Y.; IMAI, K. "Flow-injection analysis with chemiluminescence detection of glucose and uric-acid using immobilized enzyme reactor". *Anal. Sci.*, 7(5): 715, 1991.

NAVAS, M. J. & JIMÉNEZ, A. M. "Review of chemiluminescent methods in food analysis". *Food Chem.*, 55(1): 7, 1996.

NOGUEIRA, A. R. A.; MACHADO, P. L. O. A.; SANTANA DO CARMO, C. A. F. & FERREIRA, J. R. *Manual de Laboratório: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos. 1. Coleta, Acondicionamento e Preparo de Amostras*. 5a ed. São Carlos, EMBRAPA - CPPSE, 1998. 72p.

O'NEILL, S. L.; FELDMAN, B. F. "Hemolysis as a factor in clinical chemistry and hematology of the dog". *Vet. Clin. Path.*, **18**: 58, 1989.

OLIVEIRA, C.C.; SARTINI, R. P.; REIS, B.F.; ZAGATTO, E. A. G. "Multicommutation in flow analysis. Part 4. Computer-assisted splitting for spectrophotometric determination of copper and zinc in plants". *Anal. Chim. Acta*, **332**: 173, 1996.

PALILIS, L. P. & CALOKERINOS, A. C. "Analytical applications of chemiluminogenic reactions". *Anal. Chim. Acta*, **413**: 175, 2000.

PALLESCHI, G.; RATHORE, H. S. "Amperometric probe for 3-hydroxybutyrate with immobilized 3-hydroxybutyrate dehydrogenase". *Anal. Chim. Acta*, **209**: 223, 1988.

PASQUINI, C. & OLIVEIRA, W. A. "Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium (VI), ammonia, and phosphorus". *Anal. Chem.*, **57**: 2575, 1985.

PAYNE, J. M., DEW, S. M., MANSTON, R., FAULKS, M. "The use of a metabolic profile test in dairy herds". *Vet. Rec.*, 87(6): 150, 1970.

PAYNE, J. M. & PAYNE, S. *The Metabolic Profile Test*. New York, Oxford University Press, 1987. 179p.

PERONE, C. A. S. *Determinação Amperométrica e Espectrofotométrica de Fenóis Usando Extrato Bruto de Inhame (Alocasia macrorrhiza)*. Araraquara, Programa de Pós-Graduação em Química – UNESP, 1996. Tese de doutorado, p. 38.

PRINCE, N. C. & LEWIS, S. *Fundamentals of Enzymology*. 2a ed. Oxford, Oxford Science Publications, 1989. p. 10

QIN, W.; ZHANG, Z. & LIU, H. "Chemiluminescence flow sensor for the determination of vitamin B₁₂". *Anal. Chim. Acta*, **357**: 127, 1997.

QIN, W.; ZHANG, Z.; LI, B.; LIU, S. "Chemiluminescence flow-sensing system for hydrogen peroxide with immobilized reagents". *Anal. Chim. Acta*, **372**: 357, 1998.

QUÍMICA-Universidade Federal de Santa Catarina, URL <http://qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/colesterol.html>, 2003.

RADER, D. J. "Pathophysiology and management of low high-density lipoprotein cholesterol". *Am. J. Cardiol.*, **83**: 22F, 1999.

REIS, B. F. & BERGAMIN FILHO, H. "Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo". *Quim. Nova*, 16(6): 570, 1993.

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.

RICARDO, C. P. P. & TEIXEIRA, A. R. N. *Enzimas*. 4a ed. Lisboa, Plátano Editora S. A., 1993. 159p.

RIDDER, C.; HANSEN, E.H.; RUZICKA, J. "Flow injection analysis of glucose in human serum by chemiluminescence". *Anal. Lett.*, **15**: 1751, 1982.

RIFAI, N.; WARNICK, G. R.; DOMINICZAK, M. H. *Handbook of Lipoprotein Testing*. AACC Press: Washington, 1997. p.75

ROBARDS, K. & WORSFOLD, P. J. "Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence". *Anal. Chim. Acta*, **266**: 147, 1992.

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.

ROINE, K.; SALONIEMI, H. "Incidence of infertility in dairy cows". *Acta Vet. Scand.*, **19**: 354, 1978.

RUZICKA, J. & HANSEN, E. H. "Flow injection analysis. Part 1. A new concept of fast continuous flow analysis". *Anal. Chim. Acta*, **78**: 145, 1975.

RUZICKA, J. & MARSHALL, G. D. "Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays". *Anal. Chim. Acta*, **237**: 329, 1990.

SASAMOTO, H.; MAEDA, M.; TSUJI, A. "Chemiluminescent enzymatic assay for cholesterol in serum using lucigenin". *Anal. Chim. Acta*, **310**: 347, 1995.

SCHMIDT-NIELSEN, K. *Fisiologia Animal*. São Paulo, Edgard Blucher Ltda, 1972. 139p.

SEITZ, W. R. & HERCULES, D. M. "Determination of trace amounts of iron(II) using chemiluminescence analysis". *Anal. Chem.*, **44**(13): 2143, 1972.

SIGMA Diagnostics. β -hydroxybutyrate, cat. 310-A, ST. Louis - USA. 1994.

SILVA, J. F. C. & LEÃO, M. I. *Fundamentos de Nutrição dos Ruminantes*. Piracicaba, Livroceres Ltda, 1979. 384 p.

SILVA, J. F.; PANNALL, P. R. *Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment*. London, Lloyd-Luke, 1984, p.193

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.

SKEGGS, L. T. "An automatic method for colorimetric analysis". *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**: 311, 1957.

SON, J.; GRANT, R. J. & LARSON, L. L. "Effects of tallow and escape protein on lactational and reproductive performance of dairy cows". *J. Dairy Sci.*, **79**: 822, 1996.

STEWART, J. W. B. & RUZICKA, J. "Flow injection analysis. V. Simultaneous determination of nitrogen and phosphorous in acid digests of plant material with a single spectrophotometer". *Anal. Chim. Acta*, **82**: 137, 1976.

STRYER, L. W. H. *Biochemistry*. 4a ed. New York, Freeman and Company, 1995. p.181

SUELTER, C. H. *A Practical Guide to Enzymology*. New York, John Wiley & Sons, 1985. p. 27

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.

TIETZ, N. W. *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1970. p.154

VALCÁRCEL, M. "Analytical-Today's definition and interpretation". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **343**: 814, 1992.

VEENHUIZEN, J. J.; DRACKLEY, J. K.; RICHARD, M. J.; SANDERSON, T. P.; MILLER, L. D.; YOUNG, J. W. "Metabolic changes in blood and liver during development and the treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows". *J. Dairy Sci.*, **74**: 4238, 1991.

VOET, D. & VOET, J. G. *Biochemistry*. 2a ed. New York, John Wiley & Sons, 1995. p. 332

WALCARIUS, A. "Analytical applications of silica-modified electrodes. A comprehensive review". *Electroanal.*, **10**: 1217, 1988.

WHITAKER, J. R. *Principles of Enzymology for Food Sciences*. New York, Marcel Dekker, 1972.

WITTWER, F. "Empleo de los perfiles metabólicos en el diagnóstico de desbalances metabólicos nutricionales en el ganado". *Buiatria*, **2**: 16, 1995.

WITTWER, F., CONTRERAS, P. A. "Consideraciones sobre el empleo de los perfiles metabólicos en ganado lechero". *Arch. Med. Vet.*, **12** (1): 180, 1980.

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.

ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C. & COLLINS, C. H. "Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo". *Quim. Nova*, **22**(1): 143, 1999.

ZHOU, Y.; NAGAOKA, T.; LI, F. & ZHU, G. "Evaluation of luminol-H₂O₂-KIO₄ chemiluminescence system and its application to hydrogen peroxide, glucose and ascorbic acid assays". *Talanta*, **48**: 461, 1999.