

Universidade Federal de Juiz de Fora

Pós Graduação em Química

Mestrado em Química

Carla Alice Theodoro Batista

**DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR ELETROQUÍMICO PARA ANÁLISE DE  
LACTATO EM AMOSTRAS DE URINA E SALIVA**

Juiz de Fora

2012

Carla Alice Theodoro Batista

## **Desenvolvimento de um sensor eletroquímico para análise de lactato em amostras de urina e saliva**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Professora Dra. Denise Lowinsohn

Juiz de Fora

2012

Batista, Carla Alice Theodoro.

Desenvolvimento de um sensor eletroquímico para análise de lactato em amostras de urina e saliva / Carla Alice Theodoro Batista. – 2012.

86f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. Análise (Química). 2. Urina - Análise. I. Título.

CDU 543.061

*Dedico esta Dissertação  
à minha família e ao Leleó.  
Amo muito todos vocês.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais essa conquista e por conduzir os meus passos durante toda caminhada.

Ao meu pai, João Batista, que de onde está olha e torce por mim todos os dias.

À minha mãe, Cinira, pelas palavras amigas que tanto incentivaram e incentivam, pelas orações e por sempre acreditar no meu potencial.

Aos meus irmãos, Aline e Carlos, pelo incentivo, paciência e carinho de sempre.

Ao meu noivo Leleo, por toda paciência e por sempre acreditar que eu sou capaz.

À minha família como um todo e em especial, Eike, Laisla e Leila, pelo apoio e carinho.

À Professora Dra. Denise, orientadora, pelo conhecimento transmitido, pela paciência e pela confiança.

Ao professor Marcone pela ajuda neste trabalho, pela confiança que foi em mim depositada e pelo estímulo.

Às amigas Gilvânia, Ângela e Alessandra pelas conversas, pelo apoio e por estarem sempre dispostas a me ajudar em todas as horas.

Ao Fernando pelas análises feitas no eletroforese capilar e pela amizade, afinal de contas sem ele eu não teria o Tigrão.

Aos professores Dora, Júlio, Lilian, Rafael, e Renato pelo conhecimento transmitido e pela amizade conquistada.

Aos amigos do NUPIS: Aparecida, Camila, Daniel, Diego, Fausto, Felipe, Fernanda, Gláucio, Gustavo, Marcelo, Marcos, Mellina, Michele, Paola, Rafaela, Taymara, Thaís, William e Yara pelo convívio e pelos bons momentos.

A todos os professores do Departamento de Química da UFJF pelos ensinamentos.

Aos órgãos de fomento: CAPES, CNPq, FAPEMIG e PROPESQ/UFJF pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma apoiaram a realização deste trabalho.

## RESUMO

Neste trabalho são apresentados resultados relacionados a estudos sobre o comportamento eletroquímico do lactato e do peróxido de hidrogênio em diversos eletrodos utilizando voltametria cíclica. O comportamento eletroquímico do peróxido de hidrogênio em eletrodos modificados com filme de Azul da Prússia utilizando eletrodos de ouro, compósito e carbono vítreo também foi investigado. Em uma segunda etapa desenvolveu-se um biossensor eletroquímico para determinar lactato por meio do monitoramento do peróxido de hidrogênio produzido na reação catalisada do lactato com oxigênio na presença da enzima lactato oxidase. Nessa etapa, o trabalho consistiu em imobilizar a enzima lactato oxidase na superfície do eletrodo, previamente, modificado com Azul da Prússia, com o auxílio de Nafion<sup>®</sup>. Após a construção do biossensor e a otimização das condições de análise (vazão, potencial, volume de amostra, quantidade de enzima e volume de Nafion) para obtenção de maior sensibilidade no desenvolvimento do método para a determinação de lactato por análise em fluxo, averiguou-se a repetibilidade das medidas ( $C_{\text{lactato}} = 0,20 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) obtendo-se um desvio padrão de 7,1% para 27 repetições. A frequência analítica foi estimada em 41 injeções por hora. Foi obtido um limite de detecção de  $2,95 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e um limite de quantificação igual a  $9,84 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . O biossensor foi aplicado na quantificação de lactato em amostras biológicas (urina e saliva). Os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com aqueles oriundos do uso de método de referência.

**Palavras-chave:** biossensor, compósito, lactato, urina, saliva, análise por injeção em fluxo.

## ABSTRACT

This paper presents findings related to studies on the electrochemical behavior of lactate and hydrogen peroxide in various electrodes using cyclic voltammetry. The electrochemical behavior of hydrogen peroxide on modified electrodes with Prussian blue film using gold electrodes, composite and glassy carbon was also investigated. In a second step it was developed an electrochemical biosensor for determining lactate by monitoring the hydrogen peroxide produced in the reaction catalyzed lactate with oxygen in the presence of the enzyme lactate oxidase. At this stage, the work consisted of the enzyme lactate oxidase immobilized on the electrode surface, previously modified with Prussian Blue, with the aid of Nafion<sup>®</sup>. After the construction and optimization of the biosensor analysis conditions (flow rate, potential, sample volume, amount of enzyme and volume of Nafion) for obtaining greater sensitivity in development of the method for the determination of lactate by flow analysis, it was investigated whether the repeatability of measurements ( $C_{\text{lactate}} = 0.20 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) obtaining a standard deviation of 7.1% to 27 repetitions. The analytical frequency was estimated to 41 injections per hour. It was obtained a detection limit of  $2.95 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  and a limit of quantification equal to  $9.84 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ . The biosensor was applied to the quantification of lactate in biological samples (urine and saliva). The results obtained by the proposed method were compared with those from the use of the reference method.

**Keywords:** biosensor, composite, lactate, urine, saliva, flow injection analysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Metabolismo da glicose anaeróbia. ....	1
<b>FIGURA 2:</b> Analisadores enzimáticos de lactato (A) portátil e (B) automático. Fontes: <a href="http://www.hopkinsmedicalproducts.com">http://www.hopkinsmedicalproducts.com</a> e <a href="http://www.ysilifesciences.com">http://www.ysilifesciences.com</a> , respectivamente. ....	4
<b>FIGURA 3:</b> Imobilização enzimática por adsorção.....	18
<b>FIGURA 4:</b> Imobilização da enzima através da microencapsulação.....	19
<b>FIGURA 5:</b> Imobilização enzimática por oclusão em gel. ....	20
<b>FIGURA 6:</b> Ligação covalente cruzada utilizada para imobilizar a enzima. ....	22
<b>FIGURA 7:</b> Método de imobilização através da ligação covalente.....	23
<b>FIGURA 8:</b> Potenciostato/Galvanostato portátil PalmSens. ....	26
<b>FIGURA 9:</b> Célula eletroquímica constituída de três eletrodos. ....	27
<b>FIGURA 10:</b> Eletrodos: (A) Eletrodo de referência Ag/AgCl (NaCl saturado), (B) Eletrodo de trabalho de pasta de carbono e (C) Eletrodo auxiliar de platina.....	28
<b>Figura 11:</b> Sistema de análise por injeção em fluxo juntamente com a célula eletroquímica utilizada.....	34
<b>FIGURA 12:</b> Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando (I) eletrodo de ouro, (II) eletrodo de carbono vítreo e (III) eletrodo compósito, em solução contendo HCl 0,01 mol.L <sup>-1</sup> e KCl 0,1 mol.L <sup>-1</sup> (a), na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> (A.b) e na presença de lactato 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> (B.b). $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$ . ....	40
<b>FIGURA 13:</b> Curva de calibração obtida para H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , utilizando os eletrodos modificados com AP sendo (a) eletrodo compósito, (b) eletrodo de ouro e (c) eletrodo de carbono vítreo. $E_{\text{aplicado}} = 0,0 \text{ V}$ . ....	42
<b>FIGURA 14:</b> (A) Formação do filme de AP em eletrodo de pasta de carbono a partir da solução recém-preparada de: (I) Teste 11 e (II) Teste 9. (B) Verificação da estabilidade do filme gerado em eletrólito suporte (HCl 0,01 mol.L <sup>-1</sup> , KCl 0,1 mol.L <sup>-1</sup> ). $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$ . 15 ciclos. ....	44
<b>FIGURA 15:</b> Diagramas obtidos para os ensaios (A) 34 (Vazão = 1,2 mL.min <sup>-1</sup> , $E_{\text{aplicado}} = 0,0 \text{ V}$ , 175 µL de padrão, 1,5 U de enzima e 15 µL de Nafion) e (B) 27 (Vazão = 0,6 mL.min <sup>-1</sup> , $E_{\text{aplicado}} = 0,2 \text{ V}$ , 50 µL de padrão, 2 U de enzima e 20 µL de Nafion), utilizando lactato 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> . ....	49

<b>FIGURA 16:</b> Superfície de resposta obtida para o planejamento de experimentos $3^2$ . .....	53
<b>FIGURA 17:</b> Estudo do tempo versus corrente para a desnaturação da enzima. (o que eu teria que alterar nesta figura?) .....	55
<b>FIGURA 18:</b> Diagrama para obtenção da curva analítica para padrão de lactato. $E_{\text{aplicado}} = -0,15 \text{ V}$ . Em <i>inset</i> a curva analítica.....	56
<b>FIGURA 19:</b> Curva amperométrica em solução tampão fosfato pH 6,9 com adições sucessivas de lactato em urina sintética, utilizando o biossensor. $E_{\text{aplicado}} = 0,00 \text{ V}$ . Curva amperométrica obtida sob agitação. Em <i>inset</i> a curva analítica. ....	59
<b>FIGURA 20:</b> Curva amperométrica em solução tampão fosfato pH 6,9 com adições sucessivas de lactato em saliva sintética, utilizando o biossensor. $E_{\text{aplicado}} = 0,00 \text{ V}$ . Curva amperométrica obtida sob agitação. Em <i>inset</i> a curva analítica. ....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Concentrações de reagentes utilizadas para otimizar a obtenção do filme de AP. ....	32
<b>TABELA 2:</b> Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial $2^5$ . ....	34
<b>TABELA 3:</b> Fatores e níveis utilizados para realizar o planejamento $3^2$ . ....	34
<b>TABELA 4:</b> Condições utilizadas para analisar as amostras de urina e saliva humanas. ....	35
<b>TABELA 5:</b> Composição da urina sintética pH 6,0 (SEMAAN & CAVALHEIRO, 2006). ....	36
<b>TABELA 6:</b> Composição da saliva sintética pH 6,7 (SANNA et al, 2002). ....	36
<b>TABELA 7:</b> Procedimento para análise de lactato. ....	37
<b>TABELA 8:</b> Diferentes concentrações dos reagentes utilizados na modificação e estabilidade do filme de AP. ....	43
<b>TABELA 9:</b> Matriz fatorial $2^5$ com ponto central para otimizar o sistema eletroanalítico. ....	47
<b>TABELA 10:</b> Respostas analíticas para o lactato obtidas a partir da matriz do planejamento fatorial $2^5$ . ....	48
<b>TABELA 11:</b> Valores dos efeitos e das interações obtidos para o planejamento fatorial $2^5$ . ....	50
<b>TABELA 12:</b> Matriz fatorial $3^2$ com ponto central. ....	51
<b>TABELA 13:</b> Respostas analíticas para o lactato obtidas a partir da matriz do planejamento fatorial $3^2$ . ....	51
<b>TABELA 14:</b> Condições de análise otimizadas por FIA. ....	53
<b>TABELA 15:</b> Comparação entre o método proposto e o UV. ....	57
<b>TABELA 16:</b> Determinação de lactato por diferentes métodos analíticos encontrados na literatura. ....	57
<b>TABELA 17:</b> Valores de F e t calculados. ....	58
<b>TABELA 18:</b> Resultados obtidos para a determinação de lactato em urina sintética. ....	60

**TABELA 19:** Comparação dos resultados obtidos para a saliva sintética. ....61

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>EQUAÇÃO 1:</b> Conversão de lactato a acetato por meio da enzima lactato monooxigenase (LMO).....	5
<b>EQUAÇÃO 2:</b> Conversão de lactato a piruvato por meio da enzima lactato desidrogenase (LMO).....	5
<b>EQUAÇÃO 3:</b> Conversão de lactato a piruvato através da enzima lactato oxidase (LOX).....	6
<b>EQUAÇÃO 4:</b> Reação química do flavocitocromo $b_2$ com o lactato.....	6
<b>EQUAÇÃO 5:</b> Reação química do flavocitocromo $b_2$ com o mediador.....	6
<b>EQUAÇÃO 6:</b> Oxidação eletroquímica da forma reduzida do mediador.....	6
<b>EQUAÇÃO 7:</b> Concentração de lactato em $\text{mg.dL}^{-1}$ .....	38
<b>EQUAÇÃO 8:</b> Concentração de lactato em $\text{mmol.L}^{-1}$ .....	38
<b>EQUAÇÃO 9:</b> Formação do par catódico AP/Branco da Prússia.....	44
<b>EQUAÇÃO 10:</b> Formação do par anódico AP/Verde de Berlin.....	44
<b>EQUAÇÃO 11:</b> Limite de detecção.....	56
<b>EQUAÇÃO 12:</b> Limite de quantificação.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AP - Azul da Prússia

APS - 1-aminopropil sílica

BG – “Berlin Green”

[BMIM][PF<sub>6</sub>] - 1-butil-3-metilimidazoliohexafluorofosfato

2, 7- BFEFO - 2, 7-bis (Ferrocenylethynyl) Fluoren-9-one

CZE - Eletroforese capilar de zona

e<sup>-</sup> - Elétron

E - Potencial

EQM - Eletrodos quimicamente modificados

FIA - Análise por injeção em fluxo

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

FC b<sub>2</sub> - Flavocitocromo b<sub>2</sub>

LD – Limite de detecção

LDH - Lactato desidrogenase

LMO - Lactato monooxigenase

LOX - Lactato oxidase

LQ – Limite de quantificação

Me-HCF - Metais hexacianoferratos

NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleotídeo no estado oxidado

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo no estado reduzido

pH - Potencial hidrogeniônico

PW – “Prussian White”

r – Raio

R<sub>i</sub> – Resposta da corrente

v - Velocidade de varredura

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	LACTATO E SUA DETERMINAÇÃO	1
1.2	ELETRODOS COMPÓSITOS	7
1.3	ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS	10
1.4	BIOSSENSORES	12
1.5	IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	16
1.5.1	Adsorção	17
1.5.2	Microencapsulação	19
1.5.3	Oclusão em gel	20
1.5.4	Ligação covalente cruzada	21
1.5.5	Ligação covalente	22
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>24</b>
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	24
3.2	INSTRUMENTAÇÃO E MATERIAIS	26
3.2.1	Eletrodos	28
3.2.1.1	Eletrodo de referência de Ag/AgCl	28
3.2.1.2	Eletrodos de trabalho	29
3.2.1.2.1	Construção do eletrodo compósito	30
3.3	ESTUDOS VOLTAMÉTRICOS E AMPEROMÉTRICOS	30

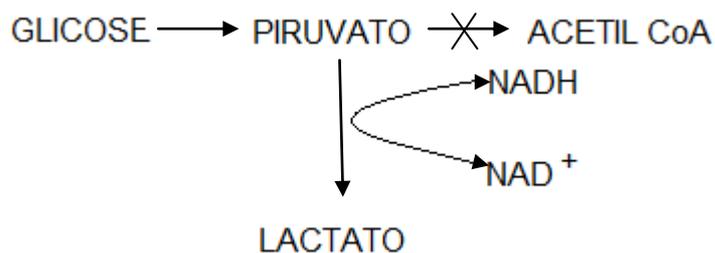
3.3.1	Verificação do comportamento eletroquímico do peróxido de hidrogênio e do lactato .....	30
3.3.2	Modificação da superfície dos eletrodos, verificação da estabilidade do filme e comportamento do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em diferentes eletrodos.....	31
3.3.3	Otimização da modificação da superfície do eletrodo compósito.....	31
3.3.4	Análise do pH do meio para quantificação de peróxido de hidrogênio.....	32
3.3.5	Construção do biossensor.....	33
3.3.6	Análise por injeção em fluxo (FIA): Otimização dos parâmetros analíticos..	33
3.4	AMOSTRAS.....	35
3.5	MÉTODO COMPARATIVO UV-VIS .....	37
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
4.1	VERIFICAÇÃO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E DO LACTATO.....	38
4.2	MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS ELETRODOS, VERIFICAÇÃO DA ESTABILIDADE DO FILME E COMPORTAMENTO DO H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	41
4.3	ESTUDOS UTILIZANDO O ELETRODO DE PASTA DE CARBONO.....	42
4.3.1	Modificação da superfície do eletrodo.....	42
4.3.2	Estudo do pH para análise de peróxido de hidrogênio.....	45
4.3.3	Análise por injeção em fluxo (FIA).....	46
4.4	AMOSTRAS SINTÉTICAS .....	58
4.4.1	Urina sintética.....	59
4.4.2	Saliva sintética .....	60
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>

## 1 Introdução

### 1.1 Lactato e sua determinação

O lactato é conhecido por ser um dos metabólitos mais importantes na análise clínica, é o produto final da degradação anaeróbica de glicogênio ou glicose, formado a partir do piruvato (MACHADO, 2009). Em atividades físicas de longa duração, o suprimento de oxigênio nem sempre é suficiente, logo o organismo busca esta energia em fontes alternativas produzindo o lactato.

Os níveis de lactato podem estar associados à insuficiência respiratória, doenças cardíacas, desordem metabólica, problemas nos tecidos, trombose e às condições físicas de animais e atletas (LOWINSOHN, 2007). A determinação do lactato também é usada no controle de diabetes, pois a sua concentração no sangue sobe rapidamente como resultado do metabolismo da glicose anaeróbica quando a entrega de oxigênio aos tecidos do corpo é insuficiente (FIGURA 1).



**FIGURA 1:** Metabolismo da glicose anaeróbica.

Além disso, a concentração de L-lactato é de grande interesse na medicina clínica e esportiva, pois seus níveis estão relacionados ao metabolismo anaeróbico (FIGURA 1) durante a contração muscular, sendo que diversas condições patológicas também podem causar um aumento na produção do mesmo (LOWINSOHN, 2007). Pessoas saudáveis, em repouso, têm valores aproximadamente entre 1 e 2 mmol.L<sup>-1</sup>, mas valores significativamente mais elevados são obtidos em condições de muito exercício (LOWINSOHN & BERTOTTI, 2007). O lactato no sangue também aumenta após as refeições (DONG *et al*, 2012).

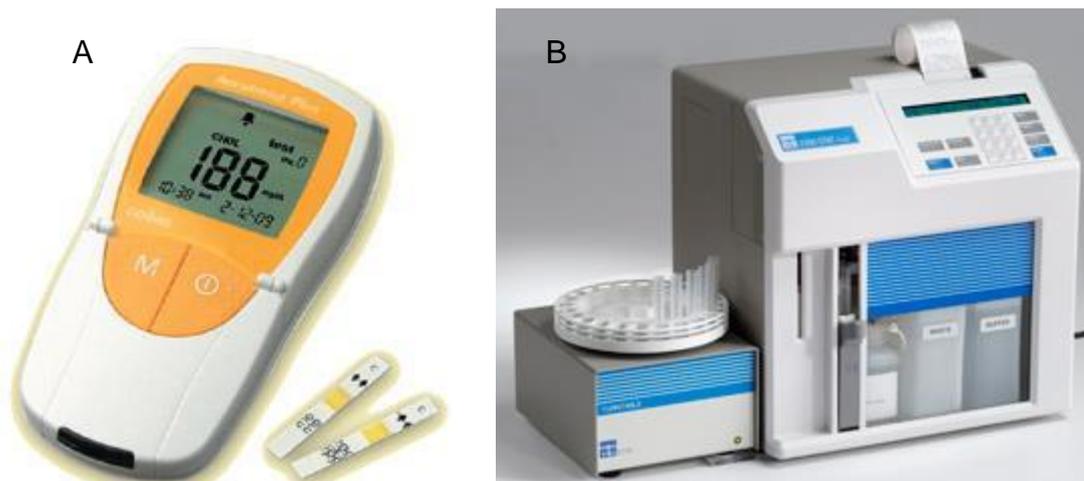
L-lactato é constantemente produzido a partir do piruvato pela lactato desidrogenase (LDH) durante o metabolismo normal e exercício. A concentração de L-lactato desempenha um papel importante no diagnóstico clínico, na validação da medicina e na análise de alimentos (PATEL *et al*, 2000). Um exemplo disto é a prevenção e o diagnóstico de uma série de distúrbios clínicos, como doenças do coração, por meio da concentração de L-lactato no sangue. Como uma alternativa às técnicas invasivas, métodos que determinam lactato em saliva e em urina têm sido desenvolvidos, uma vez que a análise de lactato na saliva pode ser utilizada como um diagnóstico preliminar para a fibrose cística (TSAI *et al*, 2007). Os resultados de lactato em saliva refletem a mesma tendência obtida com o monitoramento do lactato sanguíneo (DONG *et al*, 2012).

A saliva é um fluido de origem glandular que recobre as superfícies bucais e possui propriedades físico-químicas muito variadas, sua secreção é induzida por estímulos psíquicos, mecânicos, físicos, químicos e biológicos, e o fluxo salivar estimulado varia de 1,0 a 1,5 mL.min<sup>-1</sup> (SCHÜTZEMBERGER *et al*, 2007). A saliva é composta por aproximadamente 99,1 % de água e 0,9 % de outros componentes, destes incluem-se as substâncias inorgânicas como os íons de cloreto, sódio, potássio, cálcio, fosfato, fluoreto, bicarbonato, substâncias orgânicas como albumina, ácido úrico, creatinina, lactato, aminoácidos e alguns hormônios, além de restos alimentares, microrganismos, produtos do metabolismo bacteriano, entre outros. A composição salivar varia de um indivíduo para outro e na mesma pessoa diversas vezes ao dia. A saliva apresenta alta viscosidade, baixa solubilidade, e elasticidade, tem a função de

limpeza, proteção e manutenção do pH bucal (MACHADO, 2007; MOURA *et al*, 2007, SCHÜTZEMBERGER *et al*, 2007).

A urina é um líquido excretado pelos rins através das vias urinárias, pelo qual são eliminadas substâncias desnecessárias ao organismo. Uma vez que é o principal mecanismo de eliminação de substâncias tóxicas ao organismo ou ingeridas em excesso, sua composição varia muito de um indivíduo para o outro em função da idade, diferenças na alimentação e atividades. A urina é composta aproximadamente por 95 % de água e 2 % de ureia. Nos 3 % restantes, pode-se encontrar fosfato, sulfato, amônia, magnésio, cálcio, ácido úrico, creatinina, sódio, potássio, lactato e outros elementos (KARAK & BHATTACHARYYA, 2011). Desempenha um papel importante na regulação do balanço de líquidos e no equilíbrio entre ácidos e bases. Em estado normal, a urina fresca é cristalina e translúcida, mas com o passar do tempo ocorre hidrólise da ureia, com conseqüente formação de amônia (fermentação amoniacal). O aumento na concentração de íons amônio faz com que o pH se eleve e ocorra precipitação de fosfatos, que são relativamente insolúveis em meio alcalino. A urina alcalina, então, pode ser turva (BUENO *et al*, 2005). A quantidade de urina produzida diariamente é de 1 a 1,5 litros, contudo, este valor pode aumentar ou diminuir dependendo da quantidade de líquido ingerido.

Para realizar a análise da concentração do lactato na área desportiva, os métodos mais comuns são os analisadores enzimáticos automáticos e os analisadores portáteis (FIGURA 2), que utilizam uma pequena quantidade de sangue, cerca de 25  $\mu$ L (MACHADO, 2007).



**FIGURA 2:** Analisadores enzimáticos de lactato (A) portátil e (B) automático. Fontes: <http://www.hopkinsmedicalproducts.com> e <http://www.ysilifesciences.com>, respectivamente.

Biossensores eletroquímicos e eletrodos seletivos também são comumente usados para a determinação de lactato. Estes precisam ser modificados por enzimas ou polímeros.

O principal problema encontrado quando se trabalha com estes biossensores ou eletrodos em amostras biológicas é o envenenamento da superfície dos mesmos por componentes macromoleculares do meio, que pode ser superado utilizando uma técnica de separação, como por exemplo, a eletroforese capilar de zona (CZE) (DONG *et al*, 2012). Além das técnicas eletroanalíticas e da CZE, diferentes técnicas podem ser encontradas na literatura para determinar lactato podendo ser citados a cromatografia gasosa (SAVORY & KAPLAN, 1966; TEAFORD & KAPLAN, 1967), métodos que envolvem reações enzimáticas com detecção bioluminescente (GIROTTI *et al*, 1990) e espectrofotométrica (OLSON, 1962). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com espectrofotometria de radiação ultravioleta ou detecção por índice de refração está entre os métodos mais comuns de análise para determinação da concentração de lactato. No entanto, este método é demorado devido à necessidade de pré-tratamento da amostra e por ser um procedimento complicado levando à procura por um método sensível, simples e preciso (RAHMAN *et al*, 2009). Em geral, a análise de lactato é baseada em

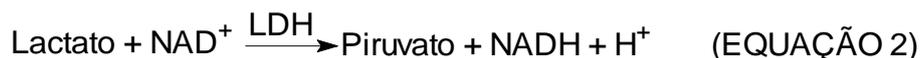
espectrofotometria, esta possui alta precisão e serve de base ou validação para outros métodos. Além disto, é um método sensível, ideal quando a substância a ser analisada encontra-se em baixas concentrações, como por exemplo, o lactato salivar, mas apresenta a desvantagem de precisar de maior quantidade de amostra e mais tempo para executar as análises (MACHADO, 2007). Assim, rápido, eficiente, barato e fácil de executar os biossensores são essenciais. Neste caso, os biossensores amperométricos preenchem estes requisitos (TSAI *et al*, 2007).

Os biossensores para lactato podem ser preparados com enzimas que catalisam a conversão de:

- lactato a acetato por meio da enzima lactato monooxigenase (LMO), cujo progresso da reação (EQUAÇÃO 1) é controlado pelo consumo de oxigênio. A reatividade deste sensor é inibida por algumas substâncias, como fosfato, oxalato, maleato, piruvato.

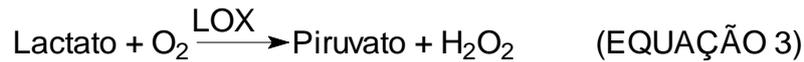


- lactato a piruvato por meio da enzima lactato desidrogenase (LDH) através do monitoramento de NADH (EQUAÇÃO 2). Os biossensores baseados em LDH são instáveis, apresentam dificuldade de regenerar a forma oxidada da coenzima ( $\text{NAD}^+$ ) e a oxidação direta do NADH exige potenciais muito positivos, o que pode permitir a interferência de outros compostos eletroativos normalmente presentes em amostras reais (RAHMAN, 2009).

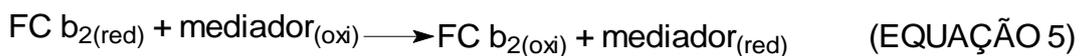


- lactato a piruvato através da enzima lactato oxidase (LOX) por meio do monitoramento do peróxido de hidrogênio (EQUAÇÃO 3) que está presente em inúmeras reações biológicas como principal produto de várias oxidases e é um

parâmetro importante na quantificação destes bio-processos (MATTOS *et al*, 2003). Como a enzima LOX é específica, não sofre interferências químicas e nem de mudanças de pH e com o objetivo de detecções rápidas e baratas vem sendo utilizada na preparação de sensor de lactato (LOWINSOHN, 2007).



- lactato a piruvato por meio do flavocitocromo  $b_2$  (FC  $b_2$ ) que pode ser isolado de leveduras, como por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. A enzima flavocitocromo  $b_2$  apresenta a vantagem de não precisar de um cofator e de ser específica para lactato, porém é muito cara. As EQUAÇÕES 4 e 5 são reações químicas do flavocitocromo  $b_2$  com o lactato e com o mediador, respectivamente, e a EQUAÇÃO 6 é a oxidação eletroquímica da forma reduzida do mediador que é usada para detecção amperométrica do lactato (GARJONYTE *et al*, 2009).



No presente trabalho, foi utilizada a enzima lactato oxidase devido às vantagens por ela apresentadas.

## 1.2 Eletrodos compósitos

Os materiais compósitos são formados pela combinação de duas ou mais fases de diferente natureza na qual cada fase mantém suas características individuais, porém a mistura pode apresentar novas características químicas, físicas ou biológicas (PEREIRA *et al*, 2002). Os compósitos com características condutoras tais como materiais a base de carbono, podem ser utilizados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Estes materiais apresentam grande intervalo de potencial de trabalho, baixa resistência e baixa corrente residual, além de serem inertes quimicamente (CONCEIÇÃO, 2004; SILVA, 2006).

Os eletrodos conhecidos como pasta de carbono ou compósito são amplamente utilizados. A pasta de carbono constitui-se de uma mistura de grafite em pó e um líquido orgânico (aglutinante). O pó de grafite usado na preparação do compósito deve possuir alta pureza química, baixa capacidade de adsorção de oxigênio e de impurezas eletroativas, e apresentar tamanho de partículas uniforme. O aglutinante é utilizado para dar consistência à mistura, ele deve ser eletroinativo, imiscível com a solução do analito, quimicamente inerte, livre de impurezas, apresentar baixa volatilidade e deve preencher os interstícios entre as partículas de grafite (CONCEIÇÃO, 2004; SILVA, 2006). Podem ser usados como aglutinantes: hidrocarbonetos alifáticos (hexano, octano, decano), mistura de hidrocarbonetos (óleo mineral, parafina) (SVANCARA *et al*, 1996; AMINI *et al*, 2002; LEI *et al*, 2003; SABZI *et al*, 2007; LIU *et al*, 2011; MAZLOUM-ARDAKANI *et al*, 2011), compostos aromáticos (benzeno, naftaleno), graxas (óleo de silicone) (VYTRAS *et al*, 2009), entre outros.

Os eletrodos de pasta de carbono possibilitam a modificação interna do material eletródico, na qual é possível a co-imobilização de enzimas, cofatores, mediadores, estabilizadores, resultando em uma análise sem a necessidade de adição de reagentes durante a determinação, o que não ocorre com os eletrodos sólidos convencionais onde a modificação ocorre apenas na

superfície (PEREIRA *et al*, 2002; OLIVEIRA & VIEIRA, 2006). Além disso, os eletrodos de pasta de carbono oferecem versatilidade na determinação de vários analitos de interesse, baixa corrente residual, baixa resistência elétrica, baixo ruído, baixo custo, facilidade de renovação da superfície, onde a mesma é conseguida por simples lixamento, e diversidade de fabricação da pasta (LEI *et al*, 2003; CONCEIÇÃO, 2004).

Em 1958 foi desenvolvido o primeiro eletrodo de pasta de carbono como uma tentativa de preparar um eletrodo gotejante de pasta de carbono para ser utilizado em uma ampla faixa de potenciais positivos, nos quais o eletrodo de mercúrio metálico não se aplicava devido à sua oxidação (ADAMS, 1958). O eletrodo foi construído utilizando a mistura de 1 g de carbono e 7 mL de bromofórmio prensados dentro de uma haste de Teflon que continha um fio de platina para servir de contato elétrico.

OLSON & ADAMS em 1960, construíram dois eletrodos de pasta de carbono utilizando como aglutinantes bromonaftaleno e Nujol, a fim de verificar a diferença existente entre eles quando aplicados para voltametria anódica. Foi constatado que o eletrodo de pasta de carbono feito com Nujol apresentava um alcance anódico um pouco maior do que aquele em que se usou bromonaftaleno, apesar das pastas de bromonaftaleno formarem superfícies excepcionalmente suaves e serem muito fáceis de manusear quando comparadas às pastas de Nujol que são um pouco mais difíceis de trabalhar por serem pegajosas.

ETHIENNE e colaboradores em 2001 avaliaram eletrodos de pasta de carbono modificado com 1-aminopropil sílica (APS) como um sensor eletroquímico para espécies de cobre em meio aquoso utilizando voltametria de onda quadrada com redissolução anódica. O eletrodo foi preparado pela mistura de APS, grafite de alta pureza e óleo mineral.

No trabalho de OJANI e colaboradores de 2004, um eletrodo de pasta de carbono preparado com óleo de silicone foi modificado com poli (1-naftilamina)/níquel e utilizado para a oxidação eletrocatalítica de vários carboidratos.

HOCEVAR e colaboradores em 2005 prepararam diferentes eletrodos (- um eletrodo misturando pó de grafite com óleo de silicone, - o outro eletrodo

modificando a pasta de carbono com pó de bismuto; - um terceiro eletrodo misturando pó de bismuto com óleo de silicone) para serem utilizados como sensor eletroquímico para detecção de cádmio e chumbo por voltametria de redissolução.

RAOOF *et al*, em 2007, prepararam um eletrodo de pasta de carbono modificado misturando pó de grafite com 2,7-BFEFO e óleo de parafina para determinação electrocatalítica de ácido ascórbico. No mesmo ano WANG e colaboradores compararam a atividade electrocatalítica do  $H_2O_2$  diante dos eletrodos de pasta de carbono preparado com pó de carbono e óleo de parafina e do eletrodo feito com uma mistura do líquido iônico 1-butil-3-metilimidazoliohexafluorofosfato ([BMIM][PF<sub>6</sub>]) com parafina.

Além desses eletrodos compósitos, o desenvolvimento de eletrodos de pasta de carbono modificados com enzimas vem sendo amplamente divulgado na literatura (TURNER *et al*, 1988). NAVARATNE & RECHNITZ (1992) construíram um biossensor amperométrico de pasta de carbono para a detecção de peróxido de hidrogênio usando tecido de tabaco como biocatalisador. FATIBELLO-FILHO *et al* (2001) desenvolveram um biossensor de vaselina/grafite modificado com tecido de abacate para determinar paracetamol em formulações farmacêuticas através da cronoamperometria. Esses são alguns exemplos de eletrodos compósitos com enzimas imobilizadas na sua superfície.

Além da imobilização de enzimas na superfície do eletrodo, é possível modificar a superfície desses eletrodos de pasta de carbono com diferentes compostos orgânicos e inorgânicos de modo a preparar eletrodos com propriedades electrocatalíticas e que possam permitir a imobilização de espécies mediadoras e moléculas biológicas (COX *et al*, 1991; BARD & Faulkner, 2001).

### 1.3 Eletrodos quimicamente modificados

Como a utilidade de um eletrodo é muitas vezes limitada devido a uma passivação gradual de sua superfície, eletrodos quimicamente modificados (EQMs) têm sido utilizados para minimizar os problemas encontrados quando se utilizam sensores eletroquímicos tradicionais, e conseqüentemente para aumentar a aplicabilidade e eficiência destes sensores (FREIRE *et al*, 2003).

EQMs são eletrodos com espécies quimicamente ativas imobilizadas em suas superfícies, que tem o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução, aumentando a sensibilidade e/ou seletividade de uma determinação através de um ou mais dos seguintes fenômenos: pré-concentração, eletrocatalise e exclusão de interferentes (SOUZA, 1997; PEREIRA *et al*, 2002).

A pré-concentração do analito possibilita um aumento da corrente faradaica elevando, assim, a sensibilidade da técnica voltamétrica utilizada. A ação de interferentes pode ocorrer devido a uma passivação, ou seja, uma adsorção do interferente na superfície do eletrodo impedindo o acesso da espécie de interesse ou reduzindo a velocidade de troca de elétrons, pode haver uma competição entre o interferente e a espécie de interesse pelos sítios ligantes existentes na superfície do eletrodo ou, ainda, pode acontecer eletrólise do interferente que está pré-concentrado na superfície do eletrodo ou que está em solução, em um potencial próximo ao potencial de eletrólise da espécie de interesse. A exclusão de interferentes pode ser realizada recobrando a superfície do eletrodo com uma membrana polimérica, que com base na carga e/ou tamanho irá bloquear o acesso do interferente permitindo a passagem da espécie de interesse, ou através da formação de monocamadas auto arranjadas que sejam seletivas (SOUZA, 1997; PEREIRA *et al*, 2002).

Os eletrodos de ouro, platina, carbono vítreo, filme de mercúrio e pasta de carbono são os mais usados para serem quimicamente modificados. Carbono vítreo reticulado, fibras de carbono, material plástico condutor e vidros condutores, estão incluídos entre os substratos menos utilizados. O substrato a ser modificado deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e

ser adequado para o método de imobilização selecionado (SOUZA, 1997; PEREIRA *et al*, 2002).

Entre os vários reagentes usados para a modificação de eletrodos, os metais-hexacianoferratos (Me-HCF) têm despertado atenção devido à sua excelente propriedade de transferência de elétrons. Os hexacianoferratos de metais de transição, conhecidos catalisadores eletroquímicos, se devidamente depositados na superfície do eletrodo podem ser facilmente reduzidos. Alguns hexacianoferratos estão sendo usados para o desenvolvimento de biossensores para glicose. Por exemplo, no filme de azul da Prússia (hexacianoferrato de ferro (III)), a espécie reduzida (branco da Prússia) apresenta atividade catalítica para redução do oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio em meio ácido. O filme age como mediador de elétrons entre o eletrodo e o peróxido de hidrogênio presente em solução ou formado durante o curso de uma reação enzimática. Se a atividade catalítica ocorrer em baixo potencial é possível minimizar as espécies interferentes presentes em solução e obter sensores amperométricos seletivos a  $H_2O_2$  (MATTOS *et al*, 2003; LOWINSOHN, 2007).

O filme de Azul da Prússia (AP) pode ser obtido sobre a superfície de diferentes eletrodos por meio de técnicas eletroquímicas. AP pode ser depositado sobre um substrato adequado por redução eletroquímica em uma solução de  $FeCl_3$  e  $K_3Fe(CN)_6$ . A película azul resultante, que muitas vezes é representada pela fórmula  $KFe^{III}Fe^{II}(CN)_6$ , pode ser oxidado em uma solução de KCl para formar  $Fe^{III}_4Fe^{II}(CN)_6$  (Verde de Berlin) e reduzir para formar  $K_2Fe^{II}Fe^{II}(CN)_6$  (sal de Everitt). Este filme é insolúvel em meio aquoso, apresenta boa estabilidade química e propriedades eletroquímicas como eletrocromismo e atividade eletrocatalítica que dependem das condições de deposição, algumas dessas propriedades fazem com que esse composto possa ser utilizado como biossensor (BARD & FAULKNER, 2001; LOWINSOHN, 2007).

Um inconveniente para se trabalhar com eletrodos modificados com hexacianoferrato de ferro (III) quando aplicados para finalidades eletroanalíticas é a baixa estabilidade do filme de Azul da Prússia nos potenciais onde o

Branco da Prússia é gerado catodicamente, pois potenciais negativos são requeridos para o monitoramento seletivo do peróxido de hidrogênio nas amostras que contêm espécies reduzidas (LOWINSOHN & BERTOTTI, 2007).

Filmes de Azul da Prússia estão sendo utilizados na construção de biossensores baseados em enzimas oxidases que catalisam a reação do seu substrato específico. A detecção de peróxido de hidrogênio, para qualquer biossensor que emprega a enzima oxidase como elemento reconhecedor, é de grande importância, uma vez que a concentração de peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à concentração do analito de interesse. Entretanto, a detecção amperométrica direta de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em eletrodos convencionais requer valores de potenciais elevados (mais positivos que 0,6 V vs. Ag/AgCl) dependendo das condições experimentais, podendo possibilitar interferências de outras espécies presentes na medida de peróxido (LOWINSOHN, 2007). O uso desse filme pode minimizar tais interferências visto que esses materiais provaram ser excelentes mediadores para a redução de peróxido de hidrogênio em potenciais menos positivos (MATTOS & GORTON, 2001; GARJONYTE & MALINAUSKAS, 1998).

#### **1.4 Biossensores**

Um biossensor pode ser definido como um sensor que combina a alta seletividade de um elemento biológico sensível ao analito de interesse, ligado a um transdutor que converte o sinal biológico em sinal elétrico proporcional à concentração do analito (ROSATTO *et al*, 2001; OLIVEIRA & VIEIRA, 2006). Este sinal pode ser resultado de uma mudança na concentração de prótons, a liberação ou absorção de gases, como amônia ou oxigênio, emissão de luz, absorção ou reflexão, emissão de calor, e assim por diante, provocada pela reação catalisada pela enzima. O transdutor converte este sinal em uma

resposta mensurável, como a atual mudança de temperatura, potencial ou absorção de luz por meio eletroquímico, meios térmicos ou ópticos. Este sinal pode ser amplificado, processado ou armazenado para posterior análise (MULCHANDANI & ROGERS, 1998). Em outras palavras, um biossensor é um sensor modificado com material biológico ligado à superfície de um transdutor.

Dentre os materiais biológicos mais comuns estão as enzimas, os antígenos, os anticorpos, o DNA, as organelas, os tecidos, entre outros (PEREIRA *et al*, 2002). Se este material for uma enzima, o sensor é denominado biossensor enzimático, que pode fazer uso da atividade enzimática como sinal analítico a ser monitorado (MARQUES & YAMANAKA, 2008). As enzimas têm sido amplamente utilizadas como material biológico dos biossensores devido às suas propriedades de especificidade de catalisação, alta seletividade e sensibilidade (LOUZADA *et al*, 2004).

O desenvolvimento de biossensores tem sido objeto de considerável interesse, pois eles oferecem alta sensibilidade, baixo custo, independência da turbidez da amostra, alta compatibilidade com modernas tecnologias de micro fabricação, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento rápido (ROSATTO *et al*, 2001; RAHMAN *et al*, 2009). Esses biossensores podem ser utilizados em diversas áreas do conhecimento, como medicina, biologia, química, física e farmácia, bem como em diferentes setores de aplicação, tais como monitoramento ambiental, medicina, setor militar, industrial e de saúde (MARQUES & YAMANAKA, 2008). Na área ambiental, tem-se o uso para controle ambiental e para determinação de pesticidas; na área alimentícia, para determinação de glicose em café instantâneo e de sulfito em alimentos; na área farmacêutica, a determinação de ácido ascórbico, dopamina e adrenalina em fármacos; na medicina usam-se os biossensores para a determinação de ureia em urina e em soro humano e como mediadores de glicose (LOUZADA *et al*, 2004).

Entre as vantagens de se usar biossensores destacam-se o processamento imediato da amostra após a coleta, a facilidade do seu uso por operadores não especializados, o tempo de resposta rápido, a especificidade da enzima imobilizada e a seletividade do transdutor eletroquímico que fazem o teste adequado para medições em fluidos biológicos (LOWINSOHN &

BERTOTTI, 2007). Podem-se destacar também: sensibilidade, baixo custo, detecção de baixas concentrações do analito, número variável de enzimas disponíveis comercialmente, além de uma variedade de metodologias empregadas na construção destes sensores (MARQUES & YAMANAKA, 2008).

Com base no tipo de transdutor usado, os biossensores podem ser divididos em biossensores ópticos, calorimétrico, piezoelétrico e eletroquímico (CHAUBEY & MALHOTRA, 2002).

Biossensores ópticos são baseados na medição da luz absorvida ou emitida como uma consequência de uma reação bioquímica. Biossensores calorimétricos detectam um analito em função do calor liberado devido à reação bioquímica da substância a ser analisada com uma enzima adequada. Biossensores piezoelétricos operam com o princípio de geração de dipolos elétricos em submeter um cristal anisotrópico natural de estresse mecânico. A adsorção do analito aumenta a massa do cristal e altera a sua frequência fundamental de oscilação. Eles são utilizados para a medição de amoníaco, óxido nitroso, monóxido de carbono, hidrogênio, metano e certos compostos organofosforados (ABAD *et al*, 1998; MINUNNI *et al*, 1994).

Todos os biossensores, acima citados, apresentam certos inconvenientes, como por exemplo, os biossensores ópticos, embora sejam muito sensíveis, não podem ser usados em meios turvos. Os biossensores térmicos não podem ser utilizados em sistemas com mudança de pouco calor e, além disso, não são fáceis de manusear. Os biossensores eletroquímicos são os mais comumente usados, eles foram desenvolvidos para superar a maioria das desvantagens que inibem a utilização de outros tipos de biossensores. Estes biossensores são rápidos, fáceis de manusear e são de baixo custo (CHAUBEY & MALHOTRA, 2002).

Os biossensores eletroquímicos baseiam-se no fato de que durante um processo de bio-interação, as espécies eletroquímicas, tais como elétrons, são consumidos ou gerados produzindo um sinal eletroquímico que pode ser medido por um detector eletroquímico. Estes biossensores podem ser operados em meios turvos, apresentam sensibilidade instrumental comparável e são mais propícios a miniaturização. Os biossensores eletroquímicos são

baseados em potenciometria e amperometria. Eletrodos de íons seletivos (ISE), transistores de efeito de campo de íons seletivos (ISFET) e os eletrodos de pH são geralmente baseados na oxidação do substrato/produto. Dependendo da propriedade eletroquímica a ser medida por um sistema de detector, os biossensores eletroquímicos ainda podem ser divididos em biossensores condutométricos, potenciométricos e amperométricos (CHAUBEY & MALHOTRA, 2002).

Biossensores condutométricos são usados para medir as alterações na condutância entre um par de eletrodos metálicos, como uma consequência do componente biológico (SUKERTHI *et al*, 1994). Biossensores potenciométricos (PAPASTATHOPOULOS & RECHNITZ, 1975; SENILLOU *et al*, 1999; KONCKI *et al*, 2000) consistem em medir o potencial no eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência, eles funcionam em condições de equilíbrio e controlam a acumulação de carga, a corrente zero, criado pela ligação seletiva na superfície do eletrodo. Biossensores amperométricos medem as variações de corrente sobre o funcionamento do eletrodo devido à oxidação direta dos produtos de uma reação bioquímica. Técnicas amperométricas são linearmente dependentes da concentração do analito. Biossensores amperométricos podem ser baseados em sistemas diretos ou indiretos. Os sensores indiretos usam detectores convencionais para medir o substrato metabólico ou um produto de material biológico.

Dentre os três tipos de biossensores eletroquímicos, os condutométricos são usualmente não específicos e têm uma pobre razão sinal/ruído (DUFFY *et al*, 1988), por isso os biossensores potenciométricos e, principalmente, os amperométricos têm sido mais utilizados. O sensor amperométrico é mais rápido, mais sensível e preciso que o potenciométrico, pois não é necessário esperar que o equilíbrio termodinâmico seja obtido e a resposta é linear em uma faixa relativamente ampla de concentração do analito. Os biossensores amperométricos são conhecidos por serem mais baratos e altamente sensíveis para os fins clínicos, ambientais e industriais (CHAUBEY & MALHOTRA, 2002).

Compostos como o peróxido de hidrogênio e o lactato, gerados como respostas a estímulos das células, têm sido determinados por meio desses sensores.

## 1.5 Imobilização enzimática

A imobilização da enzima na superfície do eletrodo é um passo fundamental para a construção e desempenho de biossensores (TSAI *et al*, 2007). O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, aumentar a estabilidade, reduzir custos e aumentar, em alguns casos, a atividade enzimática. Esses fatores dependem principalmente da escolha apropriada do suporte e dos reagentes utilizados no processo de imobilização (OLIVEIRA & VIEIRA, 2006). O material suporte deve ser insolúvel em água, deve ter uma alta capacidade para se ligar à enzima, deve ser quimicamente inerte e mecanicamente estável (SILVA, 2010).

Alguns métodos físicos e químicos podem ser utilizados para imobilizar as enzimas sobre o transdutor ou a matriz suporte. Os métodos de imobilização podem ser divididos nas seguintes categorias: oclusão em gel, microencapsulação, adsorção física, ligação química covalente e ligação química covalente cruzada (OLIVEIRA & VIEIRA, 2006, LOWINSOHN, 2007). A oclusão e a adsorção, métodos físicos, podem ser aplicadas a muitas enzimas cujas características estruturais e funcionais sofrem poucas alterações. Os métodos químicos como a ligação covalente e cruzada, por outro lado, proporcionam ao biossensor uma melhor estabilidade na operação (SCOUTEN *et al*, 1995).

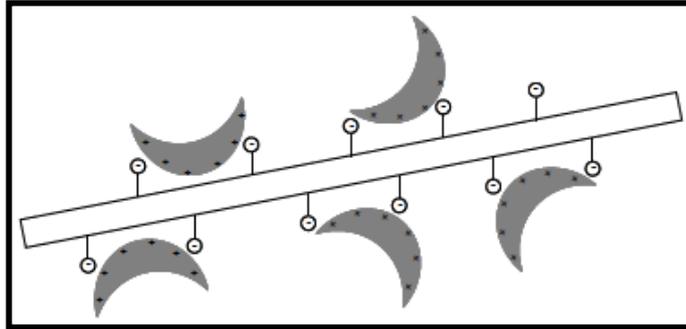
O principal problema durante o processo de imobilização de uma enzima pode ser a perda parcial ou total da atividade, que pode ser consequência de diversos fatores, como as propriedades da própria enzima, do

suporte, dos reagentes utilizados e das condições experimentais (OLIVEIRA & VIEIRA, 2006). Outros parâmetros além da enzima podem influenciar na estabilidade operacional. A estabilidade do suporte, o procedimento de imobilização e o tipo de amostra são parâmetros reconhecidamente importantes neste processo. As características de cada enzima também serão fundamentais para a escolha do procedimento de imobilização. O tipo de ligação, o material suporte, e o método de imobilização podem ter efeitos determinantes sobre a constante de ligação do substrato e a velocidade máxima da reação, e também sobre o pH ótimo e sensibilidade frente à variação da força iônica.

Saber qual o método adequado de imobilização é muito importante, pois este procedimento influencia em muitas características desejáveis para os biossensores. A seguir serão descritos alguns métodos que podem ser utilizados para imobilização de enzimas:

### **1.5.1 Adsorção**

Adsorção é um dos procedimentos mais simples de imobilização (FIGURA 3), o método baseia-se em colocar a solução da enzima em contato com uma superfície adsorvente, as enzimas podem ser adsorvidas diretamente sobre o material de eletrodo ou sobre suportes orgânicos ou inorgânicos tais como: alumina, carvão, argila, celulose, sílica gel, vidro e colágeno (ELKAOUTIT *et al*, 2008).



**FIGURA 3:** Imobilização enzimática por adsorção.

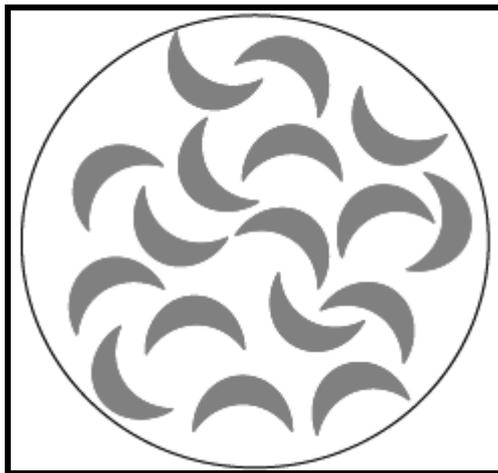
A adsorção de enzimas pode ser atribuída a um mecanismo de troca iônica, a uma simples adsorção física usualmente fraca, ocorrendo via formação de ligações de Van Der Waals ou adsorção química envolvendo ligações covalentes (ALFAYA *et al*, 2002). A adsorção de uma enzima sobre um material insolúvel em água depende do pH, da natureza do solvente, da força iônica, da concentração de enzima e adsorvente, e da temperatura. É extremamente importante conhecer e controlar esses fatores para conseguir imobilizar a enzima e mantê-la adsorvida com atividade.

A simples adsorção da enzima a uma superfície de eletrodo leva geralmente a uma baixa estabilidade operacional do biossensor, no entanto, tem sido demonstrado que a ligação cruzada com glutaraldeído aumenta a estabilidade do eletrodo enzimático (POLÁSEK *et al*, 1991). Outra possibilidade é adicionar uma barreira como, por exemplo, uma membrana ou filme para prevenir a perda da enzima adsorvida quando o biossensor é colocado em uma solução aquosa.

### 1.5.2 Microencapsulação

Neste método uma membrana inerte é usada para fixar a enzima sobre o transdutor, desta forma a solução original contendo a enzima é inteiramente imobilizada, criando células artificiais que tem uma membrana similar às células naturais para controlar o tamanho das moléculas que podem difundir para dentro e para fora da membrana (CUNNINGHAM *et al*, 1998; ALFAYA *et al*, 2002). Os principais tipos de membranas usadas são: acetato de celulose, policarbonato, colágeno, Teflon® e Nafion®. Este último é um polieletrólito aniônico capaz de repelir espécies aniônicas e permitir a passagem de cátions, ou seja, promove a exclusão de interferentes baseado na carga (repulsão eletrostática) (CONCEIÇÃO, 2004).

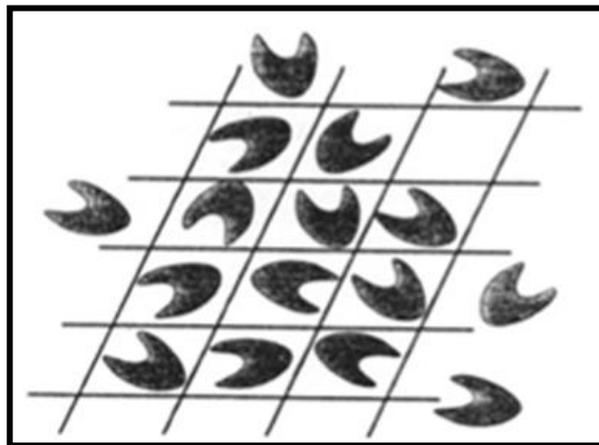
A microencapsulação (FIGURA 4) foi o método usado na construção dos primeiros biossensores (KLEI *et al*, 1985).



**FIGURA 4:** Imobilização da enzima através da microencapsulação.

### 1.5.3 Oclusão em gel

O processo de oclusão (FIGURA 5) consiste em misturar uma enzima em solução com um monômero que é, então, polimerizado em gel, fixando a enzima. Estas podem ser ocluídas em poliacrilamida, alginato de cálcio, agar. Alguns problemas estão relacionados a esta técnica como a falta de rigidez, o tamanho de poros irregular do gel e as limitações difusionais para substratos e produtos (CASS *et al*, 1998).

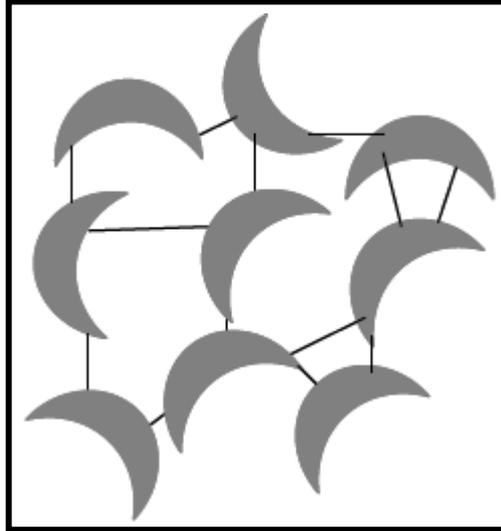


**FIGURA 5:** Imobilização enzimática por oclusão em gel.

Filmes poliméricos preparados eletroquimicamente, também são técnicas para reter fisicamente enzimas sobre a superfície do eletrodo. Estes filmes são obtidos por meio de polimerização eletroquímica de compostos orgânicos aromáticos tais como pirrol, tiofeno, fenilenodiamina, fenol, etc. A imobilização em tais membranas é realizada por deposição de um filme polimérico sobre a superfície do eletrodo sobre a qual a enzima tenha sido previamente imobilizada por adsorção ou ligação cruzada, ou por oclusão da enzima como um contra-íon a partir de uma solução de enzima e monômero (ROSATTO, 2000; ALFAYA *et al*, 2002).

#### 1.5.4 Ligação covalente cruzada

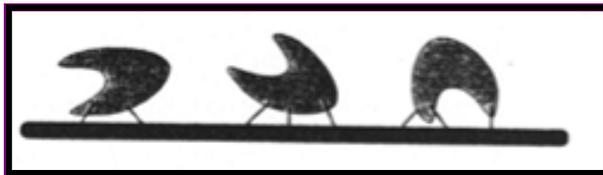
O método (FIGURA 6) consiste na formação de partículas macroscópicas (ou redes poliméricas) em decorrência da formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzima e/ou moléculas do suporte com reagentes funcionais (FATIBELLO-FILHO *et al*, 1992). Esse método mantém a enzima num ambiente semelhante ao qual ela se encontra na natureza, e devido a isto, possui maior estabilidade frente aos efeitos de pH, força iônica, solventes e temperatura. Reagentes bi ou multifuncionais (glutaraldeído, 2-isocianato-4-isotiocianato tolueno, hexametildiiisocianato, etc) são usados neste método tanto para a imobilização como para a estabilização de enzimas imobilizadas por adsorção ou oclusão (CASS *et al*, 1998; ALFAYA *et al*, 2002). A ligação covalente cruzada também possui inconvenientes como limitações difusionais, provocada pela falta de rigidez e danos à enzima. A complexidade de reações possíveis de ocorrer pode ser o fator principal para um problema frequente na imobilização com glutaraldeído, por exemplo, que é a difícil reprodutibilidade. Apesar desses riscos, é um método relativamente simples e muito utilizado para estabilizar enzimas adsorvidas e em combinação com outros métodos (OLIVEIRA NETO *et al*, 1988).



**FIGURA 6:** Ligação covalente cruzada utilizada para imobilizar a enzima.

### 1.5.5 Ligação covalente

Este método envolve a formação de ligação covalente (FIGURA 7) entre grupos funcionais da enzima e o suporte (ALFAYA *et al*, 2002). É importante que os aminoácidos essenciais para a atividade catalítica da enzima não sejam envolvidos na ligação covalente ao suporte. Como esta situação é difícil de obter, a perda da atividade enzimática pode ocorrer. Este problema pode ser prevenido se a enzima for imobilizada na presença do seu substrato como forma de proteção do sítio ativo da enzima. Antes da ligação covalente da enzima ao suporte, este deve ser ativado. Depois de ativado, o suporte pode então reagir com grupos particulares da enzima. Um exemplo desta técnica é a ligação covalente de uma enzima a um suporte via uma carbodiimida. O grupo carboxílico sobre o suporte reage com a molécula de carbodiimida, este então acopla com o grupo amina sobre o biomaterial para formar uma ligação amida entre o suporte e a enzima (CHIBATA, 1978).



**FIGURA 7:** Método de imobilização através da ligação covalente.

Neste trabalho foi utilizado o método de adsorção enzimática sobre a superfície do eletrodo modificado com o filme de AP, por ser um procedimento simples de fácil execução.

## 2 Objetivos

O objetivo principal do trabalho foi desenvolver um sensor eletroquímico para determinação de lactato em amostras biológicas.

### **Objetivos específicos:**

- Verificar a eletroatividade do lactato e do peróxido de hidrogênio em diferentes eletrodos.
- Modificar a superfície de diferentes eletrodos com o filme de Azul da Prússia, verificar a sua estabilidade e investigar o comportamento eletroquímico do peróxido de hidrogênio.

- Otimizar os parâmetros experimentais para a modificação da superfície do eletrodo.
- Construir um biossensor e utilizá-lo para a determinação de lactato por meio de monitoramento de peróxido de hidrogênio produzido na reação catalisada do lactato com oxigênio na presença da enzima lactato oxidase.
- Determinar os parâmetros experimentais que afetam as respostas do biossensor, tais como: potencial, fluxo, volume da alça de amostragem, quantidade de enzima e volume de Nafion 0,3% utilizando a análise amperométrica acoplada à injeção em fluxo.
- Utilizar o biossensor construído na determinação de lactato em amostras de saliva e urina.

### **3 Material e Método**

#### **3.1 Reagentes e soluções**

No preparo de todas as soluções utilizadas no desenvolvimento do trabalho experimental foi utilizada água ultra pura obtida de um sistema Mili-Q Millipore com resistividade igual a  $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ , sendo esta utilizada para a limpeza de toda a vidraria.

Todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza PA, ou melhor.

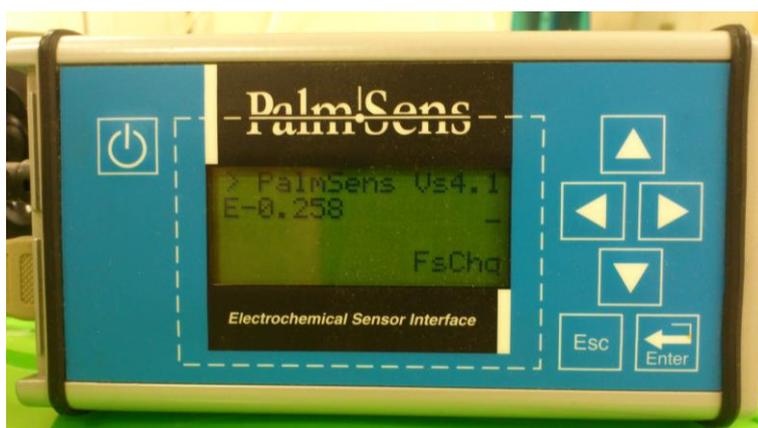
- *Ácido clorídrico*: A solução estoque foi preparada diluindo-se a solução de HCl concentrado (36,5 % - Synth) em água deionizada.
- *Ácido láctico P.A.* (Vetec): foi utilizado no preparo da saliva sintética.

- *Bicarbonato de sódio*: o sal de  $\text{NaHCO}_3$  (Vetec) foi utilizado no preparo da saliva sintética.
- *Cloreto de amônio*: o sal de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Impex) foi utilizado no preparo da urina sintética.
- *Cloreto de cálcio diidratado*: a solução estoque foi preparada dissolvendo-se o sal  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Vetec) em água deionizada.
- *Cloreto férrico*: a solução estoque foi preparada dissolvendo-se o sal  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Proquimios) em água deionizada.
- *Cloreto de potássio*: a solução estoque foi preparada dissolvendo-se o sal  $\text{KCl}$  (Vetec) em água deionizada.
- *Cloreto de sódio*: a solução estoque foi preparada dissolvendo-se o sal  $\text{NaCl}$  (Vetec) em água deionizada.
- *Ferricianeto de potássio*: a solução estoque foi preparada dissolvendo-se o reagente sólido  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (Synth) em água deionizada.
- *Fosfato de potássio monobásico*: A solução estoque foi preparada dissolvendo-se o reagente sólido  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Reagen) em água deionizada.
- *Fosfato de sódio monobásico*: o sal de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Vetec) foi utilizado no preparo da saliva sintética.
- *Hidróxido de sódio*: A solução estoque foi preparada dissolvendo-se o reagente sólido  $\text{NaOH}$  (Vetec) em água deionizada.
- *Lactato*: A solução estoque foi preparada diluindo-se a solução concentrada de  $\text{NaC}_3\text{H}_5\text{O}_3$  (50 % - Vetec) em tampão fosfato.
- *Lactato oxidase*: Foi utilizada a enzima proveniente de *Pediococcus species* (20 U  $\text{mg}^{-1}$  – Sigma Aldrich). A enzima foi dissolvida em tampão fosfato pH 6,9.
- *Nafion*: A solução estoque foi preparada a partir da solução alcoólica concentrada (5 % - Aldrich) em etanol.
- *Peróxido de hidrogênio*: A solução estoque foi preparada diluindo-se a solução  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrada (30 % - Vetec) em água deionizada.
- *Solução tampão fosfato pH*: A solução tampão foi preparada a partir das soluções de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Reagen) e  $\text{NaOH}$  (Vetec).

- *Sulfato de sódio*: o sal de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Merck) foi utilizado no preparo da urina sintética.
- *Tiocianato de potássio*: o sal de KSCN (Vetec) foi utilizado no preparo da saliva sintética.
- *Ureia* (Vetec): foi utilizada no preparo da urina sintética.

### 3.2 Instrumentação e materiais

As medidas voltamétricas e amperométricas foram realizadas empregando-se um Potenciostato/Galvanostato portátil PalmSens (FIGURA 8), acoplado a um computador equipado com o programa PS Trace.



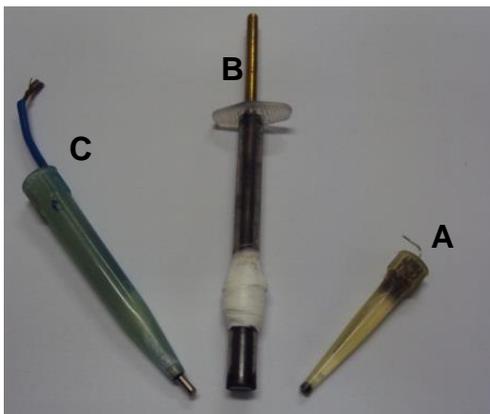
**FIGURA 8:** Potenciostato/Galvanostato portátil PalmSens.

Os experimentos eletroquímicos foram realizados empregando uma célula eletroquímica contendo o eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência (Ag/AgCl com NaCl saturado) e o eletrodo auxiliar (eletrodo de platina) imersos em uma solução contendo o analito (FIGURA 9).



**FIGURA 9:** Célula eletroquímica constituída de três eletrodos.

A FIGURA 10 mostra os eletrodos que foram utilizados na célula eletroquímica.



**FIGURA 10:** Eletrodos: (A) Eletrodo de referência Ag/AgCl (NaCl saturado), (B) Eletrodo de trabalho de pasta de carbono e (C) Eletrodo auxiliar de platina.

As medidas de pH das soluções tampão preparadas foram realizadas empregando o pHmetro Digimed D-22.

Foi utilizado um agitador magnético (IKA-lab Disc, Alemanha) com barras magnéticas para a agitação do sistema, quando necessário.

O espectrofotômetro Analyser 850 M foi utilizado para realizar as análises do método comparativo.

### 3.2.1 Eletrodos

#### 3.2.1.1 Eletrodo de referência de Ag/AgCl

O eletrodo de referência de Ag/AgCl utilizado em todas as medidas foi construído, no próprio laboratório, com base na adaptação de SILVA E SOUZA

(1998), no qual um fio de prata de aproximadamente 1 mm de diâmetro foi utilizado para a construção do eletrodo de Ag/AgCl.

Primeiramente foi efetuado o polimento do fio de prata com auxílio de uma lixa. Em seguida, utilizando este fio como eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência de Ag/AgCl (NaCl saturado) e o eletrodo de platina como eletrodo auxiliar em meio de solução de NaCl saturada foi realizada uma amperometria aplicando-se um potencial de 300 mV durante 30 s com o objetivo de se depositar AgCl sobre o fio de prata. A seguir, o fio, com o filme depositado, foi encaixado em uma ponteira plástica de uma micropipeta de 10 a 100  $\mu\text{L}$  contendo solução saturada de NaCl. Na ponta da ponteira continha um separador de baterias para evitar que os íons cloreto migrem pela junção e para evitar que a solução de NaCl presente no eletrodo vazasse para a solução a ser analisada. O eletrodo de referência construído foi testado medindo-se o potencial contra um outro eletrodo de referência. Estando fora de uso, o eletrodo foi mantido em meio de uma solução de NaCl saturado.

### **3.2.1.2 Eletrodos de trabalho**

Inicialmente, as análises foram realizadas utilizando os eletrodos de ouro (2 mm de diâmetro), carbono vítreo (2 mm de diâmetro) e eletrodo composto (4 mm de diâmetro) como eletrodos de trabalho.

### 3.2.1.2.1 Construção do eletrodo compósito

Foram utilizados 75 % de pó de grafite e 25 % de parafina (aglutinante), % m/m, para a construção do eletrodo de pasta de carbono. O compósito foi aquecido para homogeneizar a mistura (grafite + parafina) e, a seguir, foi empacotado em uma seringa.

Após o empacotamento, a superfície foi polida em papel A4 até que se obtivesse uma superfície lisa e uniforme.

O eletrodo de trabalho foi testado utilizando-se a voltametria cíclica ( $E = -0,2$  a  $1,0$  V,  $v = 50$  mV.s<sup>-1</sup>) em meio de KCl  $0,1$  mol.L<sup>-1</sup>, HCl  $0,01$  mol.L<sup>-1</sup> e K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>  $0,6$  mmol.L<sup>-1</sup>.

## 3.3 Estudos voltamétricos e amperométricos

### 3.3.1 Verificação do comportamento eletroquímico do peróxido de hidrogênio e do lactato

A eletroatividade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $1,0$  mmol.L<sup>-1</sup> e do lactato  $1,0$  mmol.L<sup>-1</sup> foi verificada em diferentes eletrodos (ouro, carbono vítreo e eletrodo compósito) realizando 1 ciclo de varredura para a voltametria cíclica, com potencial variando de  $-0,2$  a  $1,0$  V, velocidade de varredura de  $50$  mV.s<sup>-1</sup> e em meio de solução de KCl  $0,1$  mol.L<sup>-1</sup> e HCl  $0,01$  mol.L<sup>-1</sup>.

### **3.3.2 Modificação da superfície dos eletrodos, verificação da estabilidade do filme e comportamento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes eletrodos**

As superfícies dos três eletrodos foram devidamente polidas antes da modificação com o filme de AP e lavadas com água deionizada. O eletrodo compósito foi polido em papel sulfite A4 e para os demais eletrodos (carbono vítreo e ouro) utilizou-se alumina sobre uma flanela.

A modificação da superfície dos eletrodos foi realizada por voltametria cíclica variando o potencial de -0,2 a 1,0 V a 50 mV.s<sup>-1</sup> e aplicando-se 15 ciclos de varredura, para tanto foram utilizadas soluções de KCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, HCl 0,01 mol.L<sup>-1</sup>, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 0,6 mmol.L<sup>-1</sup> e FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,6 mmol.L<sup>-1</sup>. Em seguida, foi verificada a estabilidade do filme formado em eletrólito suporte (KCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, HCl 0,01 mol.L<sup>-1</sup>) realizando-se 15 ciclos de varredura, -0,2 a 1,0 V a 50 mV.s<sup>-1</sup>.

Após a estabilização do filme de AP, o comportamento eletroquímico do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 a 5 mmol.L<sup>-1</sup>) foi investigado por amperometria (0,0 V) utilizando como eletrólito suporte tampão fosfato pH 6,9.

### **3.3.3 Otimização da modificação da superfície do eletrodo compósito**

O filme de AP foi eletrodepositado na superfície do eletrodo compósito por voltametria cíclica (-0,2 a 1,0 V a 50 mV.s<sup>-1</sup>, aplicando-se 15 ciclos de varredura) em diferentes condições experimentais em soluções recém-preparadas. Foram utilizadas diferentes concentrações de HCl, KCl, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> e FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (ver TABELA 1) com a finalidade de obter a condição mais favorável, ou seja, maior estabilidade do filme, para se fazer a modificação.

**TABELA 1:** Concentrações de reagentes utilizadas para otimizar a obtenção do filme de AP.

Reagentes	Concentrações (mmol.L <sup>-1</sup> )		
KCl	50	100	200
HCl	10	20	50
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	0,4	0,6	1,2
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,3	0,6	1,2

Após a deposição do filme, a estabilidade do mesmo foi monitorada em solução de eletrólito suporte aplicando-se 15 ciclos de varredura de -0,2 a 1,0 V a 50 mV.s<sup>-1</sup>.

### 3.3.4 Análise do pH do meio para quantificação de peróxido de hidrogênio

A escolha do pH do meio é de extrema importância na análise do peróxido de hidrogênio portanto o seu estudo é de grande valia. Para isso, foi realizado um estudo do pH do meio utilizando as técnicas voltamétricas e amperométricas. A escolha do pH do tampão fosfato utilizado foi baseado nos valores de pH em que se encontram as amostras biológicas que foram analisadas.

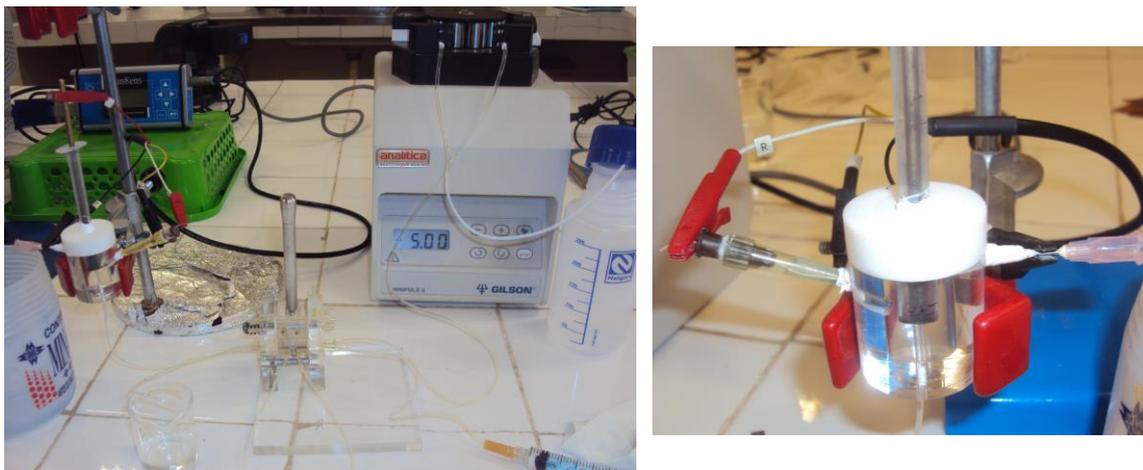
Os testes iniciais envolveram a otimização para análise de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em meio de tampão fosfato pH 6,9 e 7,2.

### 3.3.5 Construção do biossensor

O biossensor foi construído sobre a superfície do eletrodo modificado com filme de AP fazendo a imobilização de 1 U da enzima lactato oxidase através da adsorção (método físico), ou seja, a enzima foi adicionada à superfície do eletrodo e o solvente foi evaporado à temperatura ambiente. Em seguida, 10  $\mu$ L de Nafion 0,3 % foram adicionados sobre a enzima e o solvente, etanol, foi evaporado.

### 3.3.6 Análise por injeção em fluxo (FIA): Otimização dos parâmetros analíticos

O acoplamento ao sistema por injeção em fluxo torna a detecção amperométrica mais sensível, pois o analito é adicionado diretamente sobre a superfície do eletrodo (FIGURA 11) e ocorre uma menor dispersão do mesmo, portanto optou-se por trabalhar com esse sistema. Para tanto, foram realizados dois planejamentos de experimentos para otimizar os parâmetros analíticos importantes para análise de lactato. Inicialmente, foi realizado um planejamento fatorial  $2^5$  (2 níveis e 5 variáveis), com triplicata no ponto central, levando em consideração as variáveis mostradas na TABELA 2, tendo como resposta a corrente.



**Figura 11:** Sistema de análise por injeção em fluxo juntamente com a célula eletroquímica utilizada.

**TABELA 2:** Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial  $2^5$ .

Variáveis	Menor nível	Ponto central	Maior nível
Vazão ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )	0,6	1,2	1,7
Potencial (V)	-0,2	0,0	0,2
Volume de amostra ( $\mu\text{L}$ )	50	175	300
Quantidade de enzima (U)	1	1,5	2
Volume de Nafion 0,3 % ( $\mu\text{L}$ )	10	15	20

Em uma segunda etapa, foi realizado um planejamento de 3 níveis e 2 fatores ( $3^2$ ) com o intuito de se estudar o comportamento do sistema. As variáveis passaram a ser então o potencial e o volume de amostra, de acordo com a TABELA 3.

**TABELA 3:** Fatores e níveis utilizados para realizar o planejamento  $3^2$ .

Variáveis	Menor nível	Ponto central	Maior nível
Potencial (V)	-0,3	-0,15	0,0
Volume de amostra ( $\mu\text{L}$ )	200	250	300

### 3.4 Amostras

Foram analisadas amostras de urina e saliva humana utilizando as condições mostradas na TABELA 4.

**TABELA 4:** Condições utilizadas para analisar as amostras de urina e saliva humanas.

Parâmetros	Condições
Potencial	-0,15 V
Volume de amostra	250 $\mu$ L
Vazão	0,6 mL.min <sup>-1</sup>
Quantidade de enzima	2 U
Volume de Nafion 0,3 %	10 $\mu$ L

As amostras de urina foram coletadas em recipiente esterilizado. Após a coleta as amostras foram mantidas congeladas e antes de cada análise eram descongeladas.

As determinações das concentrações de lactato em urina foram realizadas utilizando 1 mL de urina, 1 mL de água deionizada e 8 mL de tampão fosfato pH 6,9.

Para avaliar a recuperação, 1 mL de amostra de urina foi dopada com lactato 0,05 mmol.L<sup>-1</sup>.

Para coletar as amostras de saliva, foi administrada goma de mascar sem açúcar para estimular a secreção de saliva que foi coletada em um béquer e analisada em seguida.

Para realização da medida do lactato em saliva foram utilizados 1 mL de saliva, 1 mL de água deionizada e 8 mL de tampão fosfato pH 6,9. Para

avaliar a recuperação, a medida foi realizada em 1 mL de amostra de saliva dopada com lactato  $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

Em paralelo à otimização dos experimentos por FIA foram realizadas as análises de lactato em urina e saliva sintéticas por meio da análise amperométrica, na qual foram adicionados  $300 \mu\text{L}$  de amostra e  $10 \mu\text{L}$  de solução padrão de lactato ( $0,0485$  a  $0,242 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) em meio de tampão fosfato pH 6,9.

A urina sintética foi preparada em água deionizada utilizando os reagentes mostrados na TABELA 5.

**TABELA 5:** Composição da urina sintética pH 6,0 (SEMAAN & CAVALHEIRO, 2006).

<b>Composto</b>	<b>Concentração (<math>\text{mmol.L}^{-1}</math>)</b>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	6,80
NaCl	51,3
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,35
KCl	26,8
NH <sub>4</sub> Cl	18,7
Uréia	416,3
Lactato	1,00

Os experimentos realizados para analisar a urina sintética foi feito conforme está descrito no item 3.3.6.

A saliva sintética, cuja composição é mostrada na TABELA 6, foi preparada em água deionizada.

**TABELA 6:** Composição da saliva sintética pH 6,7 (SANNA et al, 2002).

<b>Composto</b>	<b>Concentração (<math>\text{mmol.L}^{-1}</math>)</b>
KSCN	5,3
NaHCO <sub>3</sub>	15
KCl	20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4
Ácido láctico	10

Os experimentos realizados para analisar a saliva sintética foi feito conforme está descrito no item 3.3.6.

### 3.5 Método comparativo UV-vis

Para comparação do método eletroquímico utilizou-se a espectrofotometria UV-Vis. Para análise neste equipamento foi necessário o uso de um kit K084 (Bioclin), que é utilizado para determinar lactato em plasma ou líquido cefalorraquidiano humano. Tal kit é composto por três reagentes: Reagente enzimático, Coenzima e Padrão (Lactato 10 mg.dL<sup>-1</sup>).

Para as análises foi preparado um monorreagente constituído de uma mistura de quatro partes do reagente enzimático e uma parte da coenzima. Foram marcados tubos de ensaio com as letras B (branco), P (padrão) e A (amostra) e foi feito o procedimento descrito na TABELA 7. Em seguida, os tubos foram homogeneizados, incubados por 5 minutos a 37 °C em banho-maria e determinou-se a absorvância da amostra em 340 nm, acertando o zero com o branco. A absorvância foi lida em, no máximo, 30 minutos.

**TABELA 7:** Procedimento para análise de lactato.

	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>	<b>Amostra</b>
<b>Padrão</b>	-	10 µL	-
<b>Água</b>	10 µL	-	-
<b>Amostra</b>	-	-	10 µL
<b>Monorreagente</b>	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Para saber a concentração de lactato na amostra utilizaram-se as EQUAÇÕES 7 e 8, onde: abs. é a absorvância.

$$\text{Lactato (mg.dL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{abs. da amostra} \times \text{concentração do padrão}}{\text{abs. do padrão}} \quad (\text{EQUAÇÃO 7})$$

$$\text{Lactato (mmol.L}^{-1}\text{)} = \text{Lactato (mg.dL}^{-1}\text{)} \times 0,1109 \quad (\text{EQUAÇÃO 8})$$

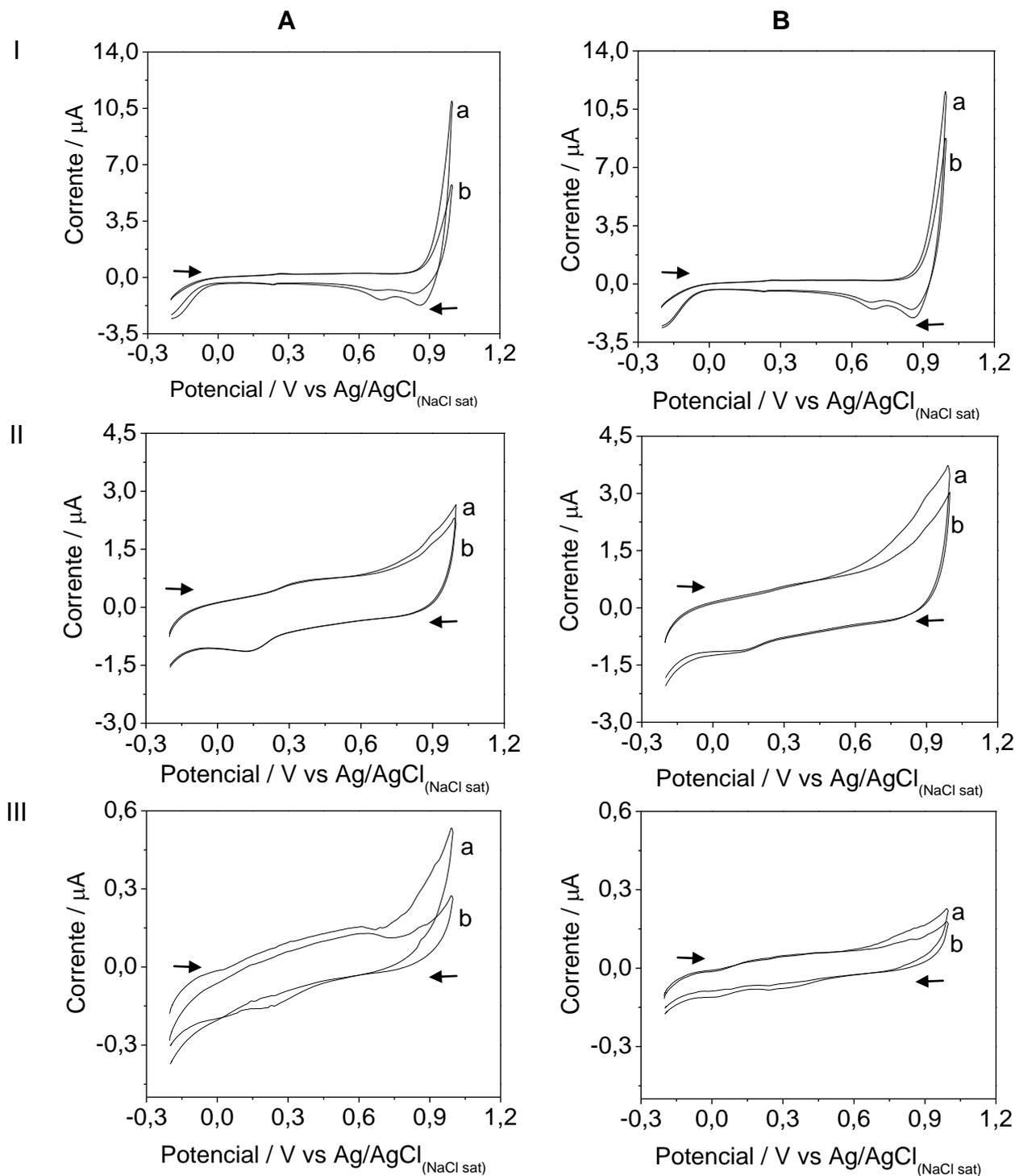
## **4 Resultados e discussão**

Inicialmente foram realizados estudos utilizando três eletrodos de trabalho modificados diferentes: eletrodo compósito, ouro e carbono vítreo, com o objetivo de averiguar a diferença de sensibilidade existente entre eles e selecionar um eletrodo para realizar os demais experimentos.

### **4.1 Verificação do comportamento eletroquímico do peróxido de hidrogênio e do lactato**

Nessa primeira etapa do projeto verificou-se a eletroatividade do peróxido de hidrogênio e do lactato na superfície dos eletrodos, de modo a selecionar um eletrodo para os trabalhos posteriores.

Como se pode observar na FIGURA 12, tanto o peróxido de hidrogênio quanto o lactato não são eletroativos na superfície de nenhum dos três eletrodos nas condições de análise, por isso a necessidade de se fazer a modificação da superfície do eletrodo utilizando o filme de Azul da Prússia.



**FIGURA 12:** Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando (I) eletrodo de ouro, (II) eletrodo de carbono vítreo e (III) eletrodo compósito, em solução contendo  $\text{HCl}$   $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  e  $\text{KCl}$   $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (a), na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  (A.b) e na presença de lactato  $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  (B.b).  $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$ .

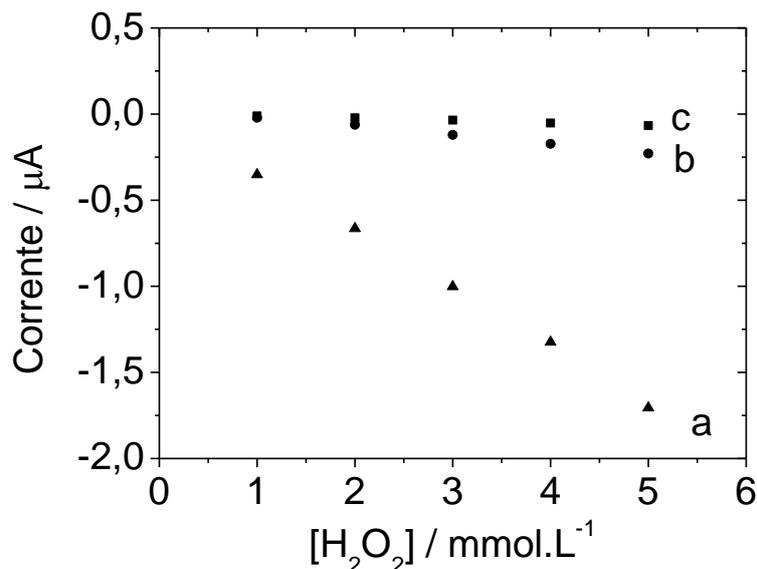
## 4.2 Modificação da superfície dos eletrodos, verificação da estabilidade do filme e comportamento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

O filme de AP serve como um intermediário para a redução do peróxido de hidrogênio em potenciais menos positivos. Sabe-se que filmes finos de AP podem ser obtidos na superfície do eletrodo ou por deposição química ou por eletrodeposição. Estes filmes podem ser facilmente reduzidos a um potencial menor que 0,2 V vs SCE, produzindo o Branco da Prússia (ou sal de Everitt) que é capaz de reduzir o peróxido de hidrogênio em um sistema eletroquímico (GARJONITE & MALINAUSKAS, 1998).

Como foi verificado que nem o peróxido de hidrogênio, nem o lactato são eletroativos na superfície dos eletrodos de ouro, carbono vítreo e eletrodo compósito foi necessário fazer a eletrodeposição do filme de AP em KCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, HCl 0,01 mol.L<sup>-1</sup>, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 0,6 mmol.L<sup>-1</sup> e FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,6 mmol.L<sup>-1</sup> realizando 15 ciclos de varredura para a voltametria cíclica (-0,2 a 1,0 V a 50 mV.s<sup>-1</sup>). A seguir, experimentos voltamétricos foram realizados para verificar a estabilidade do filme de AP em meio de KCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e HCl 0,01 mol.L<sup>-1</sup>.

Após a estabilização, o comportamento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 a 5 mmol.L<sup>-1</sup>) foi monitorado nos três eletrodos por meio da amperometria (E<sub>aplicado</sub> = 0,0 V). Para tanto, foram feitas sucessivas adições de 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup> em 10 mL de tampão fosfato pH 6,9, sob agitação constante.

Foi possível verificar, de acordo com a FIGURA 13, que o filme de Azul da Prússia suporta concentrações elevadas de peróxido de hidrogênio (1 a 5 mmol.L<sup>-1</sup>), possibilitando a construção de um sensor para a determinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> baseado neste método de preparação do filme. Pode-se observar, também, que o eletrodo compósito apresentou uma maior sensibilidade comparada aos eletrodos de ouro e carbono vítreo, este fato pode ser explicado também por ele apresentar um diâmetro maior. O eletrodo compósito foi o escolhido para dar continuidade ao trabalho.



**FIGURA 13:** Curva de calibração obtida para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando os eletrodos modificados com AP sendo (a) eletrodo compósito, (b) eletrodo de ouro e (c) eletrodo de carbono vítreo. E<sub>aplicado</sub> = 0,0 V.

### 4.3 Estudos utilizando o eletrodo de pasta de carbono

Após a escolha do eletrodo de trabalho a ser utilizado no decorrer do projeto, experimentos foram realizados com o intuito de obter as melhores condições de análise para o desenvolvimento do método.

#### 4.3.1 Modificação da superfície do eletrodo

Experimentos de voltametria cíclica foram realizados em soluções de diferentes concentrações de reagentes (TABELA 8) com a finalidade de se

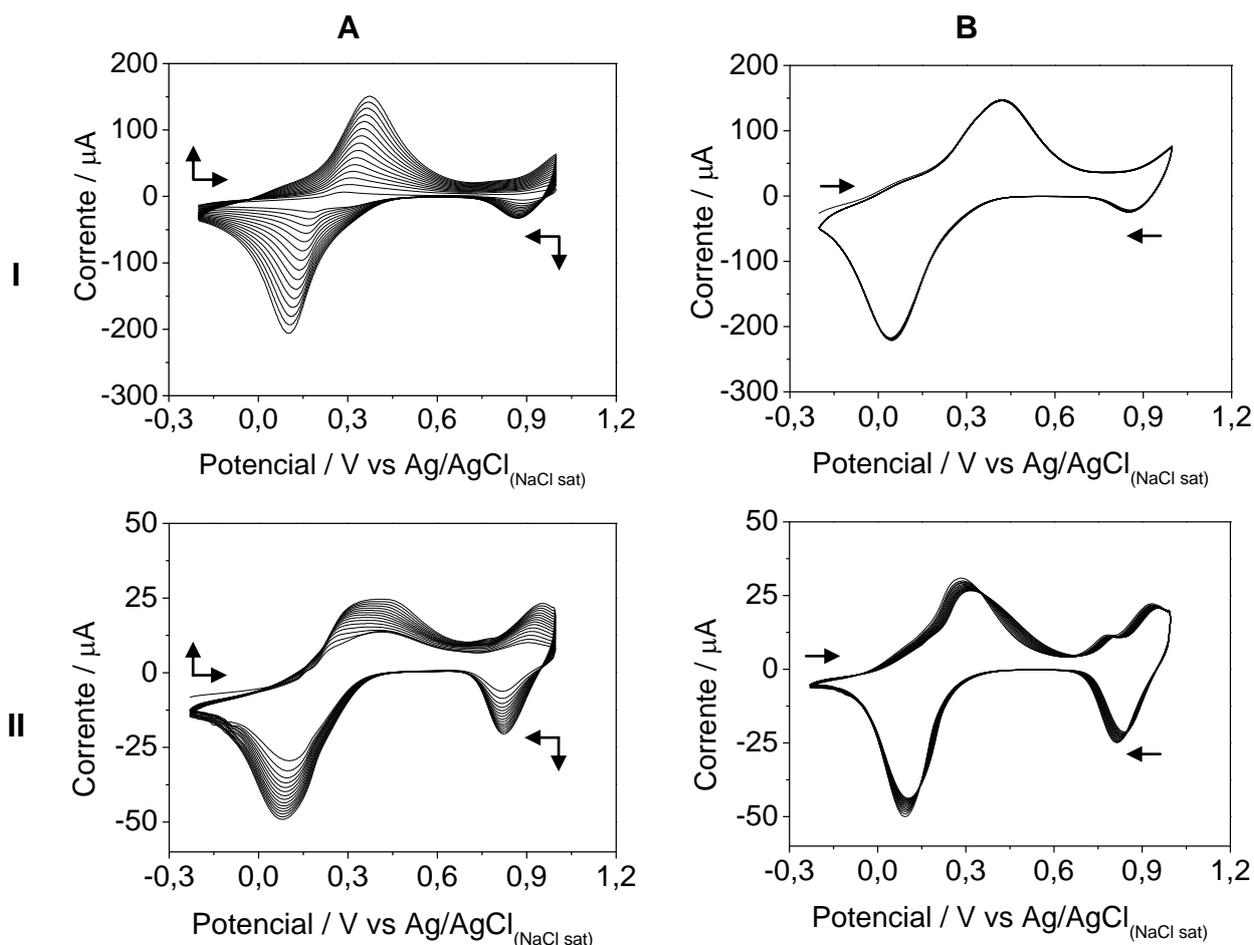
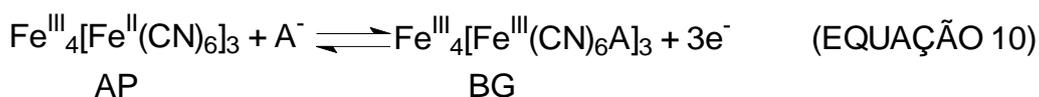
obter a melhor condição para a modificação da superfície do eletrodo com o filme de Azul da Prússia e verificar qual das condições proporcionaria eletrodo com maior estabilidade.

**TABELA 8:** Diferentes concentrações dos reagentes utilizados na modificação e estabilidade do filme de AP.

Testes	Reagentes constantes	Concentração (mol.L <sup>-1</sup> )	Reagentes variados	Concentração (mol.L <sup>-1</sup> )
1	HCl	0,02		0,05
2	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	0,6 X 10 <sup>-3</sup>	KCl	0,1
3	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,6 X 10 <sup>-3</sup>		0,2
4	KCl	0,1		0,01
5	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	0,6 X 10 <sup>-3</sup>	HCl	0,02
6	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,6 X 10 <sup>-3</sup>		0,05
7	KCl	0,1		0,3 X 10 <sup>-3</sup>
8	HCl	0,01	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	0,6 X 10 <sup>-3</sup>
9	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,6 X 10 <sup>-3</sup>		1,2 X 10 <sup>-3</sup>
10	KCl	0,1		0,3 X 10 <sup>-3</sup>
11	HCl	0,01	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,6 X 10 <sup>-3</sup>
12	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	0,6 X 10 <sup>-3</sup>		1,2 X 10 <sup>-3</sup>

Na FIGURA 14 são apresentadas duas condições mostradas na TABELA 8. O teste 9 mostra a pior condição obtida (FIGURA 14.II), ou seja, uma distorção do voltamograma para a formação do filme de AP e a falta de estabilidade do mesmo. O teste 11 que representa a condição ideal, ou seja, a melhor condição para a formação do filme, como pode ser visto na FIGURA 14.I, onde é possível verificar correntes maiores na formação do filme e uma ótima estabilização do mesmo. Observam-se, também, dois pares de picos nos voltamogramas cíclicos obtidos para a formação e estabilidade do filme de AP (Fe<sup>III</sup><sub>4</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sub>3</sub>). O primeiro pico corresponde à formação do par catódico AP / Branco da Prússia (PW – “Prussian White”) e o segundo ao par anódico AP / Verde de Berlin (BG – “Berlin Green”). A presença destes picos era esperada

devido às reações apresentadas nas EQUAÇÕES 9 e 10 (onde A é o ânion do eletrólito).



**FIGURA 14:** (A) Formação do filme de AP em eletrodo de pasta de carbono a partir da solução recém-preparada de: (I) Teste 11 e (II) Teste 9. (B) Verificação da estabilidade do filme gerado em eletrólito suporte (HCl 0,01 mol.L<sup>-1</sup>, KCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>).  $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . 15 ciclos.

O PW apresenta um efeito catalítico para a redução do oxigênio molecular e  $H_2O_2$ , enquanto o BG apresenta atividade catalítica para a oxidação do  $H_2O_2$ . Portanto, a condição realizada no teste 11 foi escolhida porque produziu eletrodos modificados com maior sensibilidade e estabilidade.

#### **4.3.2 Estudo do pH para análise de peróxido de hidrogênio**

O peróxido de hidrogênio é o produto final de muitas reações enzimática incluindo a oxidação do lactato a piruvato por meio da enzima lactato oxidase. A sua concentração é proporcional à concentração do lactato existente na amostra, por isso é necessário monitorá-lo.

Após a estabilização do filme de AP, experimentos voltamétricos e amperométricos em solução de peróxido de hidrogênio em meio de tampão fosfato (pH 6,9 e 7,2) foram realizados. O tampão aumenta a estabilidade do eletrodo modificado durante o monitoramento de peróxido de hidrogênio (LOWINSOHN, 2007) e foi utilizado porque serão analisadas amostras biológicas que possuem o pH próximo ao do tampão (pH da saliva entre 6,8 e 7,2; pH da urina entre 5,5 e 7,0). De acordo com os resultados obtidos, não houve diferença significativa da sensibilidade referente aos pHs em estudo, optou-se então por utilizar o tampão com pH 6,9, uma vez que nesta condição é possível analisar ambas as amostras.

### 4.3.3 Análise por injeção em fluxo (FIA)

Como o acoplamento ao FIA torna a detecção amperométrica mais sensível, pois o analito é adicionado diretamente na superfície do eletrodo impedindo que ocorra dispersão do mesmo, o comportamento eletroquímico do lactato frente a diferentes condições de análise foi observado de modo a otimizar os parâmetros analíticos importantes. Como esta otimização das condições de estudo é importantíssima, foi desenvolvido um planejamento experimental com o objetivo de verificar a influência de alguns fatores sobre as grandezas de interesse, eventualmente das suas interações e a minimização dos efeitos da variabilidade dos resultados. O planejamento permite melhorar as performances dos processos, atenuar a sensibilidade de seus elementos a fatores que não podem ser controlados e reduzir os custos de desenvolvimento.

O planejamento de experimento possui como principais vantagens: - diminuição do número de ensaios; - estudo de um número considerável de fatores; - detecção das interações entre os fatores; - detecção dos níveis ótimos; - melhoria da precisão dos resultados; - otimização dos resultados (BONDUELLE, 2000).

O princípio do planejamento é variar de uma só vez todos os níveis de todas as variáveis (chamadas fatores) a cada experiência. Primeiramente, foram estudadas cinco variáveis e dois níveis de acordo com o item 3.3.6, no qual todos os ensaios foram feitos em duplicata, sendo que o ponto central foi em triplicata. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória. Para tal planejamento, utilizou-se como base a matriz do planejamento mostrada na TABELA 9, na qual é possível observar as combinações dos níveis das variáveis.

**TABELA 9:** Matriz fatorial  $2^5$  com ponto central para otimizar o sistema eletroanalítico.

Ensaio	Variáveis independentes				
	Fluxo (mL.min <sup>-1</sup> )	E (V)	V <sub>alça de amostragem</sub> (μL)	C <sub>enzima</sub> (U)	V <sub>Nafion 0,3%</sub> (μL)
1	0,6	-0,2	50	1	10
2	1,7	-0,2	50	1	10
3	0,6	0,2	50	1	10
4	1,7	0,2	50	1	10
5	0,6	-0,2	300	1	10
6	1,7	-0,2	300	1	10
7	0,6	0,2	300	1	10
8	1,7	0,2	300	1	10
9	0,6	-0,2	50	2	10
10	1,7	-0,2	50	2	10
11	0,6	0,2	50	2	10
12	1,7	0,2	50	2	10
13	0,6	-0,2	300	2	10
14	1,7	-0,2	300	2	10
15	0,6	0,2	300	2	10
16	1,7	0,2	300	2	10
17	0,6	-0,2	50	1	20
18	1,7	-0,2	50	1	20
19	0,6	0,2	50	1	20
20	1,7	0,2	50	1	20
21	0,6	-0,2	300	1	20
22	1,7	-0,2	300	1	20
23	0,6	0,2	300	1	20
24	1,7	0,2	300	1	20
25	0,6	-0,2	50	2	20
26	1,7	-0,2	50	2	20
27	0,6	0,2	50	2	20
28	1,7	0,2	50	2	20
29	0,6	-0,2	300	2	20
30	1,7	-0,2	300	2	20
31	0,6	0,2	300	2	20
32	1,7	0,2	300	2	20
33	1,2	0	175	1,5	15
34	1,2	0	175	1,5	15
35	1,2	0	175	1,5	15

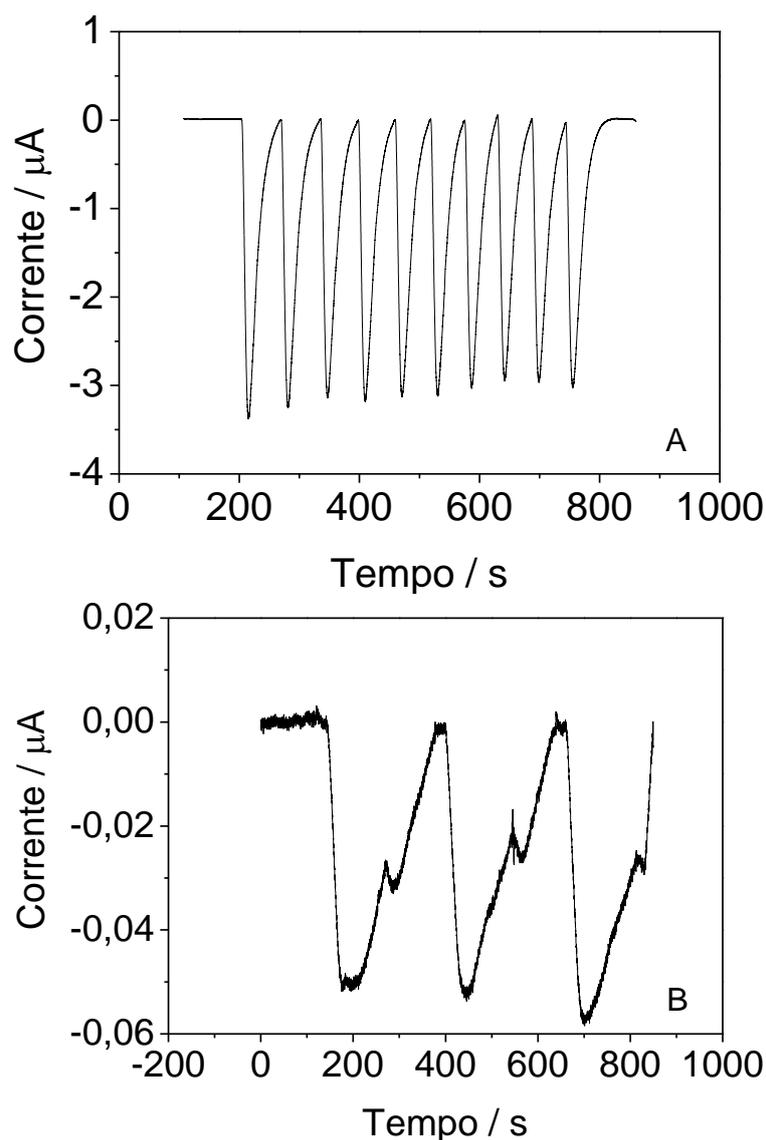
Foram obtidas as respostas analíticas para o lactato de acordo com a TABELA 10. Observa-se nesta tabela que a menor corrente obtida foi quando

se utilizou concomitantemente o fluxo e o volume da alça de amostragem em nível baixo ( $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $50 \text{ }\mu\text{L}$ , respectivamente), e o potencial ( $0,2 \text{ V}$ ), a concentração da enzima ( $2 \text{ U}$ ) e o volume de Nafion ( $20 \text{ }\mu\text{L}$ ) em nível alto (ensaio 27), pode-se observar, também, que o maior sinal obtido (ensaio 34) foi quando as análises foram executadas no ponto central (fluxo de  $1,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $175 \text{ }\mu\text{L}$  de amostra,  $1,5 \text{ U}$  de enzima,  $15 \text{ }\mu\text{L}$  de Nafion  $0,3 \%$ , aplicando-se um potencial de  $0 \text{ V}$ ).

**TABELA 10:** Respostas analíticas para o lactato obtidas a partir da matriz do planejamento fatorial  $2^5$ .

Ensaio	$-I_{\text{média}} / \mu\text{A}$	Ensaio	$-I_{\text{média}} / \mu\text{A}$
1	0,944	19	0,559
2	0,712	20	0,326
3	0,560	21	0,411
4	0,418	22	0,334
5	0,536	23	0,924
6	1,21	24	0,697
7	0,793	25	0,327
8	0,542	26	0,859
9	0,627	27	0,0462
10	0,713	28	0,0635
11	0,149	29	1,12
12	0,148	30	1,95
13	1,55	31	0,145
14	1,45	32	0,180
15	0,306	33	3,52
16	0,266	34	3,61
17	0,297	35	3,52
18	0,160		

Na FIGURA 15 observam-se as duas condições realizadas para os ensaios 27 e 34 (menor e maior sensibilidade, respectivamente), verificando uma diferença de cerca de 50 vezes entre suas sensibilidades.



**FIGURA 15:** Diagramas obtidos para os ensaios (A) 34 (Vazão =  $1,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $E_{\text{aplicado}} = 0,0 \text{ V}$ ,  $175 \mu\text{L}$  de padrão,  $1,5 \text{ U}$  de enzima e  $15 \mu\text{L}$  de Nafion) e (B) 27 (Vazão =  $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $E_{\text{aplicado}} = 0,2 \text{ V}$ ,  $50 \mu\text{L}$  de padrão,  $2 \text{ U}$  de enzima e  $20 \mu\text{L}$  de Nafion), utilizando lactato  $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Com os resultados obtidos na TABELA 10, foi feita uma avaliação dos efeitos de cada um dos parâmetros e de suas interações, como mostra a TABELA 11.

**TABELA 11:** Valores dos efeitos e das interações obtidos para o planejamento fatorial  $2^5$ .

<b>Efeitos e Interações</b>	<b>I / <math>\mu\text{A}</math></b>
M	0,856
Fluxo	0,0459
E	-0,442
$V_{\text{alça de amostragem}}$	0,344
$C_{\text{enzima}}$	0,0297
$V_{\text{Nafion 0,3\%}}$	-0,157
Fluxo x E	-0,151
Fluxo x $V_{\text{alça de amostragem}}$	0,0596
Fluxo x $C_{\text{enzima}}$	0,124
Fluxo x $V_{\text{Nafion 0,3\%}}$	0,0466
E x $V_{\text{alça de amostragem}}$	-0,146
E x $C_{\text{enzima}}$	-0,469
E x $V_{\text{Nafion 0,3\%}}$	0,127
$V_{\text{alça de amostragem}}$ x $C_{\text{enzima}}$	0,160
$V_{\text{alça de amostragem}}$ x $V_{\text{Nafion 0,3\%}}$	0,0470
$C_{\text{enzima}}$ x $V_{\text{Nafion 0,3\%}}$	0,0937

Por meio dos resultados apresentados na TABELA 11, foi realizado o teste t no qual foram definidos os intervalos de confiança dos efeitos, e estimados quais destes são significativos ou não na resposta do lactato. Desta forma, concluiu-se que a vazão e a concentração da enzima não foram fatores significativos. Também, com base nesses resultados, o volume de Nafion escolhido para os procedimentos seguintes seria o menor valor (10  $\mu\text{L}$ ), porém não foi possível diminuir ainda mais essa quantidade devido aos procedimentos operacionais.

A partir dos resultados obtidos no planejamento  $2^5$ , foi feito um novo estudo utilizando o planejamento  $3^2$ , para se determinar o potencial e o volume de amostragem que seriam utilizados. A TABELA 12 mostra a base da matriz utilizada para realizar este planejamento, na qual se observam as combinações dos níveis com as variáveis. Foi utilizada 1U de enzima LOX, 10  $\mu\text{L}$  de Nafion 0,3 % e um fluxo de 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

**TABELA 12:** Matriz fatorial  $3^2$  com ponto central.

<b>Ensaio</b>	<b>E (V)</b>	<b>V<sub>alça de amostragem</sub> (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
1	-0,30	200
2	-0,30	250
3	-0,30	300
4	-0,15	200
5	-0,15	250
6	-0,15	300
7	0,00	200
8	0,00	250
9	0,00	300
10	-0,15	250
11	-0,15	250

As respostas analíticas foram obtidas a partir destas combinações e são mostradas na TABELA 13.

**TABELA 13:** Respostas analíticas para o lactato obtidas a partir da matriz do planejamento fatorial  $3^2$ .

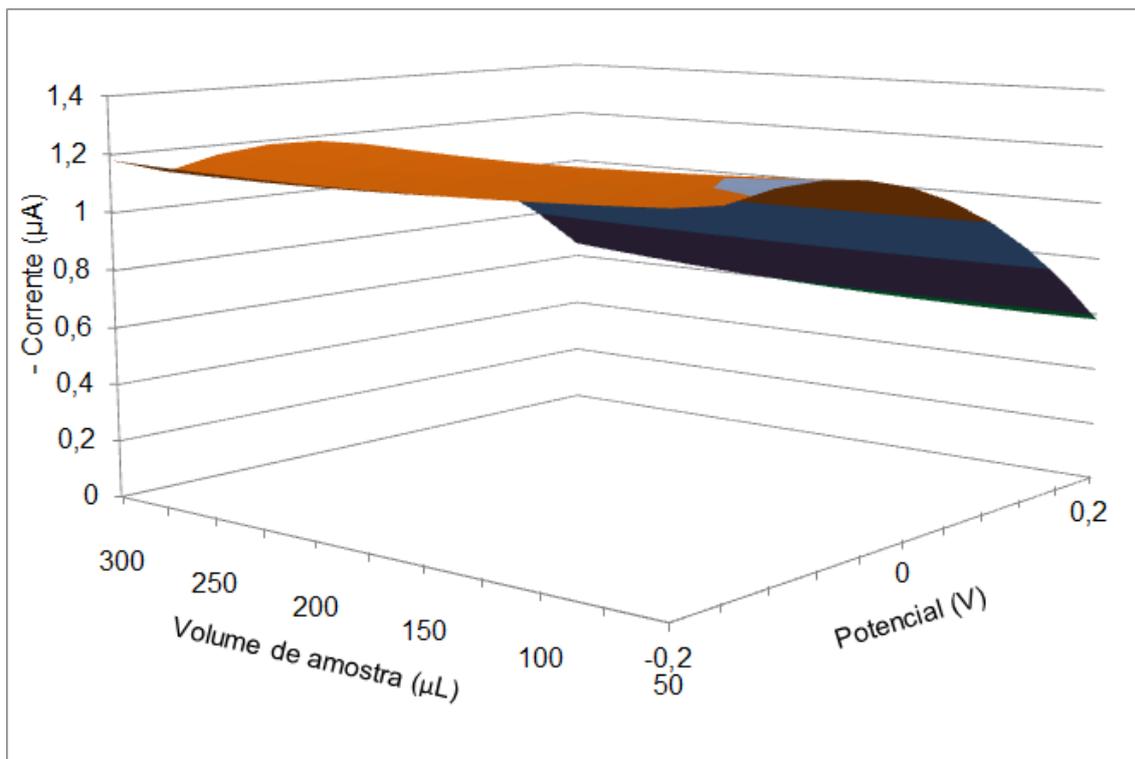
<b>Ensaio</b>	<b>-I<sub>média</sub> / <math>\mu\text{A}</math></b>
1	1,15
2	1,08
3	1,02
4	1,11
5	1,19
6	1,23
7	0,603
8	0,604
9	0,616
10	0,947
11	1,22

Analisando os resultados mostrados na TABELA 13, observa-se que a menor corrente obtida foi quando o potencial foi mantido em nível alto e o volume da alça de amostragem em nível baixo (experimento 7), enquanto que a maior resposta para a corrente foi quando o potencial e a alça de amostragem foram mantidos no ponto central e em nível alto (experimento 6), respectivamente. O modelo ajustado no conjunto experimental foi:

$$\hat{y} = 1,128(\pm 0,33) - 0,239(\pm 0,26)x_1 - 0,001(\pm 0,26)x_2 - 0,299(\pm 0,41)x_1^2 + 0,026(\pm 0,41)x_2^2 + 0,036(\pm 0,32)x_1x_2$$

Observou-se que nenhum dos coeficientes ajustados pela modelagem foi significativo no intervalo de 95 % de confiança para o intervalo experimental investigado, pois  $t_{\text{tabelado}}$  é igual a 4,303, para 2 graus de liberdade. Por outro lado, a análise de variância revelou a não ocorrência de falta de ajuste do modelo, pois  $F_{\text{falta de ajuste}} = 0,16$  foi menor do que  $F_{\text{crítico}; 0.05; 2} = 19,0$ . Logo, um estudo por metodologia de resposta pôde ser efetuado, ou seja, como não houve falta de ajuste do modelo, uma região ótima de trabalho pode ser selecionada.

A FIGURA 16 mostra a superfície de resposta obtida para o conjunto de experimentos realizados. Pela superfície de resposta é possível visualizar que para qualquer nível da alça de amostragem para um nível baixo ou central de potencial a  $R_i$  (Resposta da corrente) será acima de 1,00 (experimentos 1 a 6 e experimento 11). Por outro lado, a  $R_i$  apresentará decréscimo quando o potencial for mantido em nível alto, independente do nível da alça de amostragem (experimentos 7 a 9). Logo, uma boa estratégia analítica seria trabalhar com o nível baixo da alça de amostragem (200  $\mu\text{L}$ ) para qualquer potencial entre -0,30 e -0,15 V.



**FIGURA 16:** Superfície de resposta obtida para o planejamento de experimentos  $3^2$ .

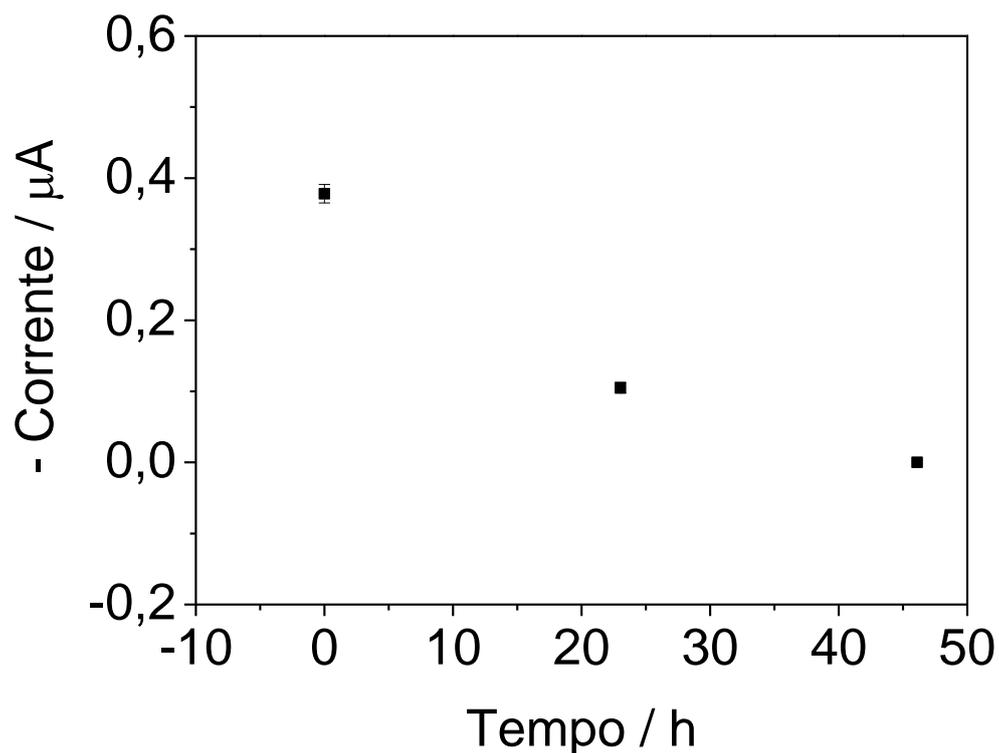
Com as condições otimizadas (TABELA 14), averiguou-se a repetitividade aparente das medidas ( $C_{\text{lactato}} = 1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) obtendo-se um desvio padrão de 19,6 % para 23 repetições, esse valor elevado de desvio deve-se a perda de sensibilidade do biossensor no decorrer das medidas (30,6 %) devido a elevada concentração de lactato utilizada. A frequência analítica foi estimada em 41 injeções por hora.

**TABELA 14:** Condições de análise otimizadas por FIA.

Parâmetros	Condições
Fluxo	$0,6 \text{ mL.min}^{-1}$
Potencial	-0,15 V
Volume da alça de amostragem	200 μL
Concentração da enzima	1 U
Volume de Nafion 0,3 %	10 μL

Baseado nos fatos observados, foram feitas injeções consecutivas de lactato  $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$  utilizando o eletrodo compósito modificado com AP, 2 U de enzima e  $10 \mu\text{L}$  de Nafion 0,3 %, mantendo-se o fluxo, o potencial e o volume da alça de amostragem obtidos na otimização (TABELA 14). Foi verificado que havia uma diminuição da perda da sensibilidade do biossensor (26 %) obtendo-se um desvio padrão de 4 % para 26 repetições. A partir de então, estas foram as condições adotadas para realizar as análises de lactato nas amostras biológicas.

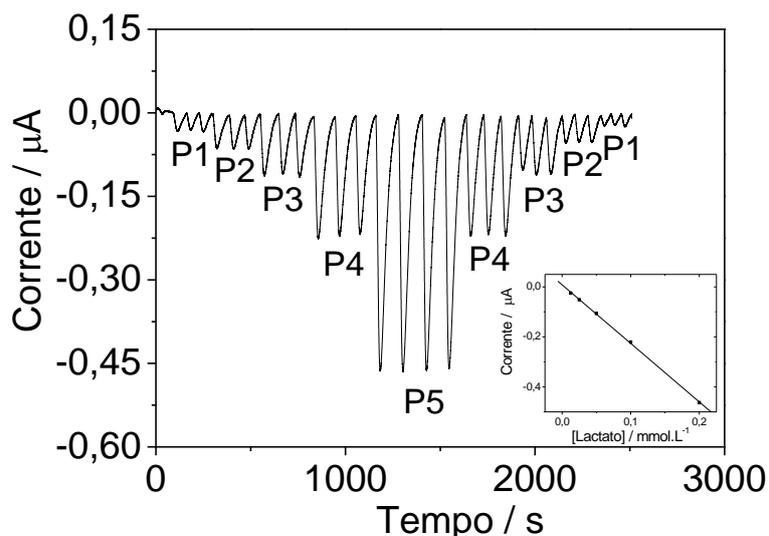
Com o objetivo de verificar a estabilidade do biossensor foram realizados experimentos em função do tempo. Para tanto, foram feitas três injeções de lactato  $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$  em três dias consecutivos utilizando o biossensor construído. O biossensor foi armazenado em tampão fosfato pH 6,9 a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Observa-se na FIGURA 17, que após 23 h a atividade da enzima diminuiu aproximadamente em um quarto da atividade inicial e que após 46 h não foi verificada a atuação da enzima sobre a superfície do eletrodo. Isso indica que a estabilidade do sensor é de extrema importância e é a parte mais difícil no desenvolvimento do projeto.



**FIGURA 17:** Estudo do tempo versus corrente para a desnaturação da enzima.

Após essa etapa, diferentes concentrações de lactato na faixa entre 0,01 a 0,2 mmol.L<sup>-1</sup> foram injetadas (FIGURA 18) de modo a construir a curva analítica (FIGURA 18 em *inset*). Observa-se que existe uma linearidade para a faixa de concentração estudada. Foi obtida a seguinte equação da reta:

$$\text{Corrente } (\mu\text{A}) = 0,00819 (\pm 0,002) - 2,34 (\pm 0,02) [\text{Lactato}] (\text{mmol.L}^{-1}), R^2 = 0,999$$



**FIGURA 18:** Diagrama para obtenção da curva analítica para padrão de lactato.  $E_{\text{aplicado}} = -0,15 \text{ V}$ . Em *inset* a curva analítica.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as EQUAÇÕES 11 e 12, respectivamente, utilizando os valores de desvios padrões obtidos para a análise em triplicata do branco (s) e o coeficiente angular da reta (S). Foram obtidos LD e LQ iguais a  $2,95 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $9,84 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente.

$$\text{LD} = \frac{3 \times s}{S} \quad (\text{EQUAÇÃO 11})$$

$$\text{LQ} = \frac{10 \times s}{S} \quad (\text{EQUAÇÃO 12})$$

A exatidão do método foi avaliada por testes de recuperação, com valores entre 43,5 e 50,5 % para a urina e 64,9 e 88,2 % para a saliva, e através da comparação dos valores de concentração do lactato obtidos por amperometria e por UV. Estes valores muito baixos podem ser devido ao fato

de se ter perda da atividade enzimática durante as análises e/ou efeito de matriz.

A TABELA 15 mostra os valores de concentração e do desvio padrão obtidos para as amostras de urina e saliva utilizando o método proposto e o método comparativo.

**TABELA 15:** Comparação entre o método proposto e o UV.

<b>Amostra</b>	<b>Método proposto (mmol.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>UV (mmol.L<sup>-1</sup>)</b>
Urina	0,20 ± 0,02	0,17 ± 0,02
Urina	0,25 ± 0,02	0,23 ± 0,07
Urina	0,37 ± 0,02	0,37 ± 0,03
Urina	0,36 ± 0,02	0,37 ± 0,03
Urina	0,41 ± 0,02	0,40 ± 0,08
Urina	0,41 ± 0,02	0,40 ± 0,08
Saliva	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,02
Saliva	0,20 ± 0,02	0,26 ± 0,02

A TABELA 16 mostra os resultados obtidos para a determinação de lactato, utilizando diferentes métodos analíticos, encontrados na literatura. Pode-se observar que para o método proposto foram obtidas concentrações próximas àquelas encontradas na literatura.

**TABELA 16:** Determinação de lactato por diferentes métodos analíticos encontrados na literatura.

<b>Método</b>	<b>Amostra</b>	<b>Lactato (mol.L<sup>-1</sup>)</b>
CZE (DONG et al, 2002)	Saliva	2,1 x 10 <sup>-4</sup> - 5,0 x 10 <sup>-4</sup>
GC-MS (KETTING et al, 1985)	Urina	1,243 x 10 <sup>-6</sup>
YSI 1500 Sport Lactate Analyzer (GREEN et al, 2004)	Suor	13,6 x 10 <sup>-3</sup>
Método proposto	Saliva	2,0 x 10 <sup>-4</sup> – 2,6 x 10 <sup>-4</sup>
	Urina	2,0 X10 <sup>-4</sup> – 4,1 x 10 <sup>-4</sup>

Foi realizado o teste F para verificar se havia diferença entre as precisões dos métodos utilizados, como todos os valores de  $F_{\text{calculado}}$  (TABELA 17) foram menores do que  $F_{\text{tabelado}} = 39$ , constatou-se que não havia diferença entre as precisões dos métodos para  $\alpha = 0,05$ . Realizou-se em seguida o teste-t pareado com variâncias não agrupadas para averiguar se existia ou não diferença entre os métodos. Como em todas as amostras o valor de  $t_{\text{calculado}}$  (TABELA 17) foi menor que  $t_{\text{tabelado}} = 2,776$ , ficou estabelecido que não há diferença entre os métodos para  $\alpha = 0,05$ .

**TABELA 17:** Valores de F e t calculados.

<b>Amostras</b>	<b><math>F_{\text{calculado}}</math></b>	<b><math>t_{\text{calculado}}</math></b>
Urina	1,06	1,389
Urina	10,9	0,536
Urina	2,52	0,106
Urina	2,83	0,094
Urina	26,5	0,232
Urina	28,9	0,363
Saliva	2,19	0,391
Saliva	2,16	2,61

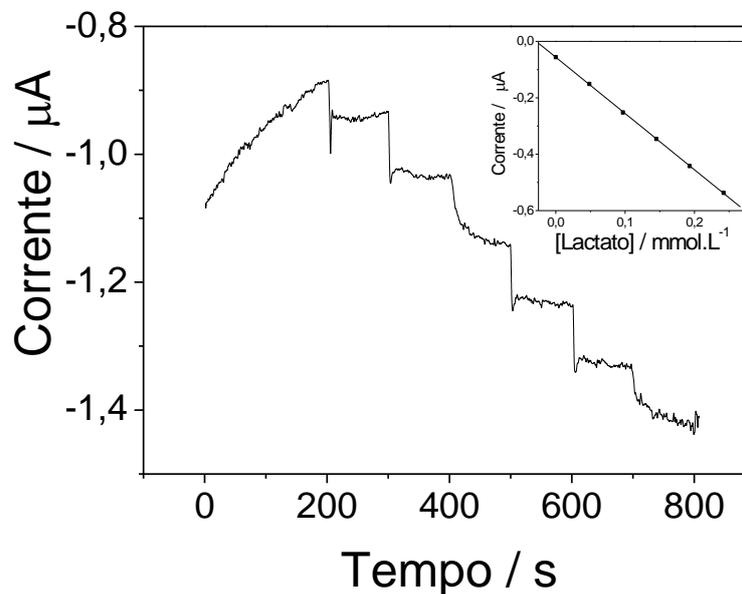
#### 4.4 Amostras sintéticas

Paralelamente à otimização dos experimentos por FIA, foram realizadas análises de lactato em amostras de urina e saliva sintéticas por amperometria após a estabilização do filme de AP, foi imobilizada 1U da enzima lactato oxidase na superfície do eletrodo compósito. Após a evaporação do solvente, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de Nafion 0,3 %.

#### 4.4.1 Urina sintética

Foram realizados alguns estudos por amperometria utilizando a amostra de urina sintética dopada com lactato  $1,00 \text{ mmol.L}^{-1}$ . A FIGURA 19 apresenta o amperograma e a curva analítica obtidos utilizando adição padrão com concentração de lactato variando de  $0,0485$  a  $0,242 \text{ mmol.L}^{-1}$ , com equação de reta:

$$\text{Corrente } (\mu\text{A}) = -0,0563 (\pm 0,001) - 1,99 (\pm 0,009) [\text{Lactato}] (\text{mmol.L}^{-1}), R^2 = 0,999$$



**FIGURA 19:** Curva amperométrica em solução tampão fosfato pH 6,9 com adições sucessivas de lactato em urina sintética, utilizando o biossensor.  $E_{\text{aplicado}} = 0,00 \text{ V}$ . Curva amperométrica obtida sob agitação. Em *inset* a curva analítica.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram comparados com o método UV enzimático utilizando a lactato desidrogenase. A comparação entre os resultados obtidos para a determinação de lactato em urina sintética (TABELA 18) foi realizada através do teste t,  $t_{\text{calculado}} = 0,112 < t_{\text{tabelado}} = 2,776$ , no qual ficou estabelecido que os dois métodos foram comparáveis para um nível de 95 % de confiança. Os altos valores de desvio obtidos para o método espectrofotométrico se devem ao fato do kit ser utilizado para amostras de plasma e líquido cefalorraquidiano e foi adaptado para análise de saliva e urina, e os altos valores obtidos para o método proposto podem ser justificados com a perda da enzima durante as análises.

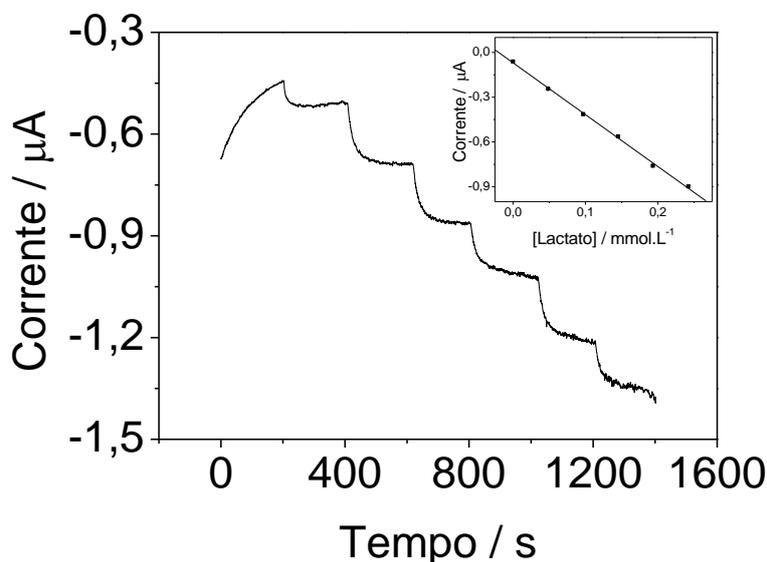
**TABELA 18:** Resultados obtidos para a determinação de lactato em urina sintética.

Amostras	Métodos	
	Amperométrico (mmol.L <sup>-1</sup> )	Espectrofotométrico (mmol.L <sup>-1</sup> )
1	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,4
2	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,4
3	1,3 ± 0,2	1,6 ± 0,4

#### 4.4.2 Saliva sintética

Foi analisada a concentração de lactato em saliva sintética, diluída em tampão fosfato pH 6,9, utilizando o método proposto. A FIGURA 20 apresenta o amperograma obtido para a adição padrão em saliva e a curva analítica obtida utilizando padrão com concentração de lactato variando de 0,0485 a 0,242 mmol.L<sup>-1</sup>, com equação de reta:

$$\text{Corrente } (\mu\text{A}) = -0,0696 (\pm 0,01) - 3,48 (\pm 0,07) [\text{Lactato}] (\text{mmol.L}^{-1}), R^2 = 0,998$$



**FIGURA 20:** Curva amperométrica em solução tampão fosfato pH 6,9 com adições sucessivas de lactato em saliva sintética, utilizando o biossensor.  $E_{\text{aplicado}} = 0,00 \text{ V}$ . Curva amperométrica obtida sob agitação. Em *inset* a curva analítica.

As análises foram realizadas em triplicata.

Observando a FIGURA 20 é possível dizer que o biossensor proposto pode ser utilizado para análise de lactato em saliva sintética, uma vez que os resultados foram comparados com o método UV-Vis (TABELA 19) e por meio do teste-t ficou estabelecido que os dois métodos foram comparáveis para um nível de 95 % de confiança, pois  $t_{\text{calculado}} = 0,432 < t_{\text{tabelado}} = 2,776$ .

**TABELA 19:** Comparação dos resultados obtidos para a saliva sintética.

Amostras	Métodos	
	Amperométrico (mmol.L <sup>-1</sup> )	Espectrofotométrico (mmol.L <sup>-1</sup> )
1	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,06
2	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,06
3	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,06

## 5 Conclusão

O eletrodo compósito apresentou grande durabilidade, pois permitiu que várias análises fossem efetuadas sem a necessidade de se construir um novo eletrodo, foram utilizados cerca de cinco eletrodos no total.

No decorrer deste trabalho foram apresentados resultados relacionados à construção de um biossensor para determinar lactato através da imobilização da enzima lactato oxidase sobre a superfície do eletrodo compósito modificado com filme de Azul da Prússia.

A estabilidade do filme de AP foi melhor alcançada e uma maior sensibilidade também foi observada quando se utilizou HCl  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ , KCl  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$   $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$  e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$  para modificar a superfície do eletrodo.

Os eletrodos modificados foram utilizados para a determinação amperométrica de lactato por meio da reação com a enzima lactato oxidase através do monitoramento de peróxido de hidrogênio aplicando-se um potencial de  $-0,15 \text{ V}$  utilizando um sistema em fluxo.

Os eletrodos modificados com filme de Azul da Prússia apresentaram boa estabilidade e, após a imobilização enzimática, mostraram-se eficientes para serem utilizados em análises de lactato em diferentes amostras clínicas, através da utilização da técnica amperométrica. Os resultados obtidos foram comparados com o método UV enzimático e pode-se observar que os métodos não apresentaram diferença significativa com a utilização do teste t.

A natureza não invasiva dos testes utilizando amostras de saliva e urina tem gerado uma grande atração para serem utilizados como métodos alternativos ao uso do sangue, uma vez que o processo de coleta é mais simples, principalmente quando diz respeito a crianças, e, também, diversos estudos confirmaram a eficácia de se analisar lactato nestes tipos de amostras.

## 6 Referências

ADAMS, R. N. Carbon paste electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 30, n.9, p. 1576-1576, 1958.

ABAD, J. M.; PARIENTE, F.; HERNÁNDEZ, L.; ABRUÑA, H. D.; LORENZO, E. Determination of Organophosphorus and carbamate pesticides using a piezoelectric biosensor. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 2848-2855, 1998.

ALFAYA, A. A.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de solgel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002.

AMINI, M. K.; KHORASANI, J. H.; KHALOO, S. S.; TANGESTANINEJAD, S. Cobalt (II) salophen-modified carbon-paste electrode for potentiometric and voltammetric determination of cysteine. **Analytical Biochemistry**, v. 320, p. 32-38, 2003.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2ª Edição. Editora Wiley, 833p. 2001.

BONDUELLE, G., M. Aplicação do planejamento de experimentos no controle da fabricação de chapas de fibras de madeira. **Cerne**, v. 6, n. 2, p. 1-10, 2000.

BUENO, F. B. A; SOUTO, G. D'A. B; LOPES, A. C.; CESARI, C. E.; CAMPOS, J. R. Avaliação de técnicas para tratamento da urina humana. **23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Campo Grande – MS, 2005.

CASS, T.; LIGLER, F. S. **Immobilized biomolecules in analysis: a practical approach**, *Oxford University*. Press: Nova lorque, 1998.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 441-456, 2002.

CHIBATA, I. **Immobilized enzymes research and development**, *John Wiley and Sons*, Nova lorque, p. 32, 1978.

CONCEIÇÃO, C. D. C. Construção e aplicação analítica de eletrodos de pasta de carbono modificada com ftalocianina de cobalto para determinação de analitos de interesse. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2004.

COX, A.; JAWORSKI, R. K.; KULESZA, P. J. Electroanalysis with electrodes modified by inorganic films. **Electroanalysis**, v. 3, p. 869-877, 1991.

CUNNINGHAM, A. J. **Introduction to bioanalytical sensors**, *John Wiley and Sons*, Nova Iorque, 1998.

DONG, Q.; DONG, R.; JIN, M.; JIN, W. Direct amperometric determination of lactate at a carbon fiber bundle microdisk electrode by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 774, p. 121-126, 2002.

DUFFY, P.; SAAD, I.; WALLACH, J. M. New development of conductometric measurements in analytical biochemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 2, n. 267, 1988.

ELKAOUTIT, M.; RODRIGUEZ, I. N.; DOMINGUEZ, M.; ARTIGA, M.; MILLA, D.; CISNEROS, H. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on Horseradish Peroxidase (HRP) enzyme immobilized in a Nafion-Sonogel-Carbon composite. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 24, p. 7131-7137, 2008.

ETIENNE, M.; BESSIERE, J.; WALCARIUS, A. Voltammetric detection for copper (II) at a carbon paste electrode containing an organically modified silica. **Sensors and Actuators B**, v. 76, p. 531-538, 2001.

FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p. 28-39, 1992.

FATIBELLO-FILHO, O.; LUPETTI, K. O.; VIEIRA, I. C. Chronoamperometric determination of paracetamol using an avocado tissue (*Persea americana*) biosensor. **Talanta**, v. 55, p. 685-692, 2001.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Empregos de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.

GARJONYTE, R.; MALINAUSKAS, A. Electrocatalytic reactions of hydrogen peroxide at carbon paste electrodes modified by some metal hexacyanoferrates. **Sensors and Actuators B**, v. 46, p. 236-241, 1998.

GARJONYTE, R.; MELVYDAS, V.; MALINAUSKAS, A. Amperometric biosensors for lactic acid based on baker's and wine yeast. **Microchim Acta**, v. 164, p. 177-183, 2009.

GIROTTI, S.; GRIGOLO, B.; FERRI, E.; GHINI, S.; CARREA, G.; BOVARA, R.; RODA, A.; MOTTA, R.; PETILINO, R. Bioluminescent flow sensor for the determination of L-(+)-lactate. **Analyst**, v.115, p. 889-894, 1990.

GREEN, J. M.; PRITCHETT, R. C.; CREWS, T. R.; McLESTER JR., J. R.; TUCKER, D. C. ; Sweat lactate response between males with high and low aerobic fitness. **European Journal Applied Physiology**, v. 91, p. 1-6, 2004.

HAJIZADEH, K.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Immobilization of lactate oxidase in a poly(vinyl alcohol) matrix on platinized graphite electrodes by chemical cross-linking with isocyanate. **Talanta**, v. 38, n. 1, p. 37-47, 1991.

HOCEVAR, S. B.; SVANCARA, I.; VYTRAS, K.; OGOREVC, B. Novel electrode for electrochemical stripping analysis based on carbon paste modified with bismuth powder. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 706-710, 2005.

KARAK, T.; BHATTACHARYYA, P. Human urine as a source of alternative natural fertilizer in agriculture: a flight of fancy or an achievable reality. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 55, p. 400-408, 2011.

KETTING, D.; WADMAN, S. K.; BRUINVIS, L.; SWEETMAN, L. The occurrence of lactyl lactate and succinyl lactate in the urine of patients screened for inherited metabolic disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 146, p. 29-35, 1985.

KLEI, H. E.; SUNDSTROM, D. W.; SHIM, D. **Immobilization of enzymes by microencapsulation**. Woodward. *Immobilized cells and enzymes: a practical approach*, p. 49, 1985.

KONCKI, R.; RADOMSKA, A.; GLAB, S. Potentiometric determination of dialysate urea nitrogen. **Talanta**, v. 52, p. 13–17, 2000.

LEI, C. X.; HU, S. Q.; SHEN, G. L.; YU, R. Q. Immobilization of horseradish peroxidase to a nano-Au monolayer modified chitosan-entrapped carbon paste electrode for the detection of hydrogen peroxide. **Talanta**, v. 59, p. 981-988, 2003.

LIU, L.-H.; DUAN, C.-Q.; GAO, Z.-N. Electrochemical behaviors and electrochemical determination of carbamazepine at ionic liquid modified carbon paste electrode in the presence of sodium dodecyl sulfate. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 76, n. 0, p. 1–17, 2011.

LOUZADA, E. S.; LUCCAS, P. O.; MAGALHÃES, C. S. D. Construção e caracterização de um biossensor potenciométrico para determinação de pirogalol. **Revista Analytica**, n. 11, p. 52-57, 2004.

LOWINSOHN, D. Desenvolvimento de um sensor para análise de lactato em amostras alimentares e biológicas. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Flow injection analysis of blood L-lactate by using a Prussian blue-based biosensor as amperometric detector. **Analytical Biochemistry**, v. 365, n. 2, p. 260-265, 2007.

MACHADO, H. S. Correlação da concentração do lactato salivar com o lactato sanguíneo para monitorar as respostas fisiológicas no exercício anaeróbio em crianças pré-púberes. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

MATTOS, I. L.; SHIRAIISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.

MATTOS, I. L.; GORTON, L. Filmes de Metal-Hexacianoferrato: Uma Ferramenta em Química Analítica. **Química Nova**, v. 24, p. 200-205, 2001.

MAZLOUM-ARDAKANI, M.; BEITOLLAHI, H.; TALEAT, Z.; SALAVATI-NIASARI, M. Fabrication and characterization of molybdenum(VI) complex-TiO<sub>2</sub> nanoparticles modified electrode for the electrocatalytic determination of L-cysteine. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.76, n. 4, p. 575-589, 2011.

MINUNNI, M.; SKLADAL, P.; MASCINI, M. A piezoelectric quartz crystal biosensor as a direct affinity sensor. **Analytical Letters**, v. 27, p. 1475-1487, 1994.

MOURA, S. A. B.; MEDEIROS, A. M. C.; COSTA, F. R. H.; MORAES, P. H.; OLIVEIRA FILHO, S. A. Valor diagnóstico da saliva em doenças orais e sistêmicas: uma revisão de literatura. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 7, p. 187-194, 2007.

MULCHANDANI, A.; ROGERS, K.R. **Enzyme and Microbial Biosensors. Techniques and Protocols**; Humana Press; Totowa; New Jersey, 1998.

NAVARATNE, A.; RECHNITZ, G. A. Improved plant tissue-based biosensor using in vitro cultured tobacco callus tissue. **Analytica Chimica Acta**, v. 257, p. 59-66, 1992.

OJANI, R.; RAOOF, J.B., AFAGH, P. S. Electrocatalytic oxidation of some carbohydrates by poly(1-naphthylamine)/nickel modified carbon paste electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 571, p. 1-8, 2004.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 932-939, 2006.

OLIVEIRA NETO, G.; YAMANAKA, H. Enzimas e materiais biológicos imobilizados: biossensores. **Química Nova**, v. 11, p. 432, 1988.

OLSON, C.; ADAMS, R. N. Carbon paste electrodes application to anodic voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 22, p. 577-582, 1960.

OLSON, G. F. Optimal conditions for the enzymatic determination of L-lactic acid. **Clinical Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 1962.

PAPASTATHOPOULOS, D. S.; RECHNITZ, G. A. Enzymatic cholesterol determination using ion-selective membrane electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 11, 1975.

PATEL, N. G.; ERLINKÖTTER, A.; CAMMANN, K.; CHEMNITIUS, G. –C. Fabrication and characterization of disposable type lactate oxidase sensors for dairy products and clinical analysis. **Sensors and Actuators B**, v. 67, p. 134-141, 2000.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002.

POLÁSEK, M.; GORTON, L.; APPELVIST, R.; MARKO-VARGA, G.; JOHANSSON, G. Amperometric glucose sensor based on glucose-dehydrogenase immobilized on a graphite electrode modified with an n,n-bis(benzophenoxazinyl) derivative of benzene-1,4-dicarboxamida. **Analytica Chimica Acta**, v. 246, p. 283, 1991.

RAHMAN, M. M.; SHIDDIKY, M. J. A.; RAHMAN, Md.A., SHIM, Y. A lactate biosensor based on lactate dehydrogenase/nicotinamide adenine dinucleotide

(oxidized form) immobilized on a conducting polymer/multiwall carbon nanotube composite film. **Analytical Biochemistry**, v. 384, p. 159-165, 2009.

RAOOF, J.B.; OJANI, R.; BEITOLLAHY, H. Electrocatalytic determination of ascorbic acid at chemically modified carbon paste electrode with 2,7-bis(ferrocenylethynyl)fluoren-9-one. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 2, p. 534-548, 2007.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.

ROSATTO, S.S. Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e sílica modificada. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

SABZI, R. E.; HASANZADEH, A.; GHASEMLU, K.; HERAVI, P. Preparation and characterization of carbon paste electrode modified with tin and hexacyanoferrate ions. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72, n. 10, p. 993-1002, 2007.

SANNA, G.; PILO, M. I.; PIU, P. C.; SPANO, N.; TAPPARO, A.; CAMPUS, G. G.; SEEBER, R. Study of the short-term release of the ionic fraction of heavy metals from dental amalgam into synthetic saliva, using anodic stripping voltammetry with microelectrodes. **Talanta**, v. 58, p. 979-985, 2002.

SAVORY, J.; KAPLAN, A. A gas chromatographic method for the determination of oactic acid in blood. **Clinical Chemistry**, v. 12, n. 9, p. 559-569, 1966.

SCOUTEN, W. H.; LUONG, J. H. T.; BROWN, R. S. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. **Tibtech**, v. 13, p. 178, 1995.

SCHÜTZEMBERGER, M. E.; SOUZA, R. T.; PETRUCCIX, R. E.; NAVAL MACHADO, M.; PAPALEXIOU, V.; BRANCHER, J. A. Análise bioquímica do fluido salivar de indivíduos portadores de doença periodontal. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 4, n. 1, p. 46-52, 2007.

SEMAAN, F. S.; CAVALHEIRO, E. T, G. Spectrophotometric determination of furosemide based on its complexation with Fe(III) in ethanolic médium using a flow injection procedure. **Analytical Letters**, v. 39, n. 13, p. 2557-2567, 2006.

SENILLOU, A.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; MARTELET, C.; COSNIER, S. A miniaturized urea sensor based on the integration of both ammonium based

urea enzyme field effect transistor and a reference field effect transistor in a single chip. **Talanta**, v. 50, p. 219–226, 1999.

SIGMA ALDRICH, 2012. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l0638?lang=pt&region=BR>. Acesso em: 15 de maio de 2012.

SILVA, J. S. Biossensor amperométrico à base de peroxidase em matriz de bastão de grafite comercial: estudos preliminares. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, R. C.; SOUZA, I. G. Eletrodos artesanais para voltametria. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 477-480, 1998.

SILVA, R. C. Preparação e aplicação de eletrodos de pasta de carbono modificadas com ditiocarbamatos para análise de fármacos. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 191-195, 1997.

SUKEERTHI, S.; CONTRACTOR, A.Q. Applications of conducting polymers as sensors. **Indian Journal of Chemistry Section A**, v. 33, n.6, p. 565–571, 1994.

SVANCARA, I.; HVÍZDALOVÁ, M.; VYTRAS, K.; KALČER, K.; NOVOTNY, R. A microscopic study on carbon paste electrodes. **Electroanalysis**, v. 8, n. 8, p. 61-65, 1996.

TEAFORD, M. E.; KAPLAN, A., Measurement of blood lactate by gas chromatography. **Clinica Chimica Acta**, v. 15, p. 133-138, 1967.

TSAI, Y.-C.; CHEN, S.-Y.; LIAW, H.-W. Immobilization of lactate dehydrogenase within multiwalled carbon nanotube-chitosan nanocomposite for application to lactate biosensors. **Sensors and Actuators B**, v. 125, p. 474-481, 2007.

TURNER, A. P. F.; KARUBE, I.; WILSON, G. S. **Biosensors: Fundamentals and Applications**. Oxford University Press: Oxford, 1988.

VYTRAS, K.; SVANCARA, I.; METELKA, R. Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 74, n.10, p. 1021–1033, 2009.

WANG, S. F.; XIONG, H. Y.; ZENG, Q. X. Design of carbon paste biosensor based on the mixture of ionic liquid and paraffin oil as a binder for high performance and stabilization. **Electrochemistry Communications**, v. 9, p. 807-812, 2007.

WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A. **Fundamentos de Química Analítica**. Ed. Cengage Learning, 2006.