

desligado (uma característica comum à maioria dos medidores deste tipo), o que ocorre automaticamente quando a pressão medida excede 3 E-4 Torr aproximadamente. S3 é um contato auxiliar da chave magnética da bomba mecânica (operada por uma rede diferente da difusora no nosso caso), impedindo o funcionamento da difusora com a bomba mecânica desligada. S1 desliga S2 e S3 para permitir a "partida" da difusora.

Finalmente, K22 liga um indicador de falha (lâmpada com pisca-pisca eletrônico no nosso caso).

COMENTÁRIOS FINAIS

O dispositivo que descrevemos já foi construído em três versões no nosso laboratório. Uma das versões utiliza um TRIAC (chave de estado sólido) ao invés de um contactor e, embora apresente bom desempenho, é limitada em termos de potência e exige cuidados com relação ao tipo de carga utilizada, o que nos levou a divulgar a versão aqui apresentada. Todas as versões mostraram-se muito confiáveis, exigindo apenas os cuidados de manter o becher limpo (pelo

uso de um filtro antes da entrada da água da difusora) e o de nunca fechar excessivamente a pinça do tubo de saída.

O circuito do sensor de nível foi testado com água destilada, funcionando normalmente, o que amplia certamente sua gama de utilização.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Financiadora de Estudos e Projeto – FINEP – e a Fundação Universitária José Bonifácio – FUJB – pelo apoio financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – pela concessão de uma bolsa de pesquisa (G.G.B. de Souza) e de apoio técnico (F.C. Pontes).

REFERÊNCIAS

- ¹ Souza, G.G.B. de; Souza, A.C.A.; *J. Phys. E: Sci. Inst.* (1985) 18, 1037.

DIVULGAÇÃO

ENZIMAS E MATERIAIS BIOLÓGICOS IMOBILIZADOS: BIOSSENSORES

Graciliano de Oliveira Neto e Hideko Yamanaka

Instituto de Química da UNICAMP; C. Postal 6154; 13081 – Campinas (SP)
Instituto de Química da UNESP; C. Postal 174; 14800 – Araraquara (SP)

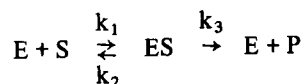
Recebido em 26/5/88

1. INTRODUÇÃO

O emprego de sensores eletroquímicos em análises enzimáticas tornou-se uma das áreas mais excitantes em pesquisa e de maior crescimento nos últimos anos.^{1,2,3,29}

Enzimas são proteínas que funcionam como catalisadores biológicos e são utilizadas em grande escala na química analítica, devido à especificidade e sensibilidade de suas reações.

As reações enzimáticas envolvendo um único substrato podem ser representadas pela expressão geral:



onde E = enzima
S = substrato
ES = complexo enzima-substrato
P = produto da reação

A combinação de enzimas com eletrodos seletivos ou voltamétricos, seja para medida da formação de "P", ou para medida de consumo de "S", oferece inúmeras vantagens, em relação a outros métodos, em termos de custo, rapidez e exatidão.

2. ELETRODOS ENZIMÁTICOS

O princípio do eletrodo enzimático é muito simples e envolve quatro etapas básicas:

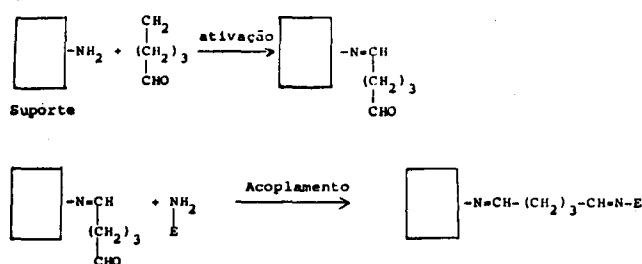
1ª *Escolha da enzima* – escolhe-se uma enzima que reaja com a substância a ser analisada. O ideal seria envolver o uso da função primária da enzima, *i.e.*, a reação principal Enzima-Substrato. Assim, para análise de glicose, seria a glicose oxidase; para salicilato, a enzima salicilato hidroxilase, etc. Em outros casos pode-se também usar uma enzima que atue sobre um composto de interesse como um substrato

secundário. Neste caso a análise estará sujeita a maiores interferências e o método será menos seletivo. No caso de existirem várias enzimas que atuem na substância de interesse analítico, via diferentes reações, a escolha dependerá da disponibilidade material de cada laboratório.

2ª *Obtenção da enzima* – escolhida a enzima consultam-se os catálogos para saber da sua disponibilidade comercial e sua pureza. Esta pode ser ou não um problema. Muitas enzimas são estáveis no estado impuro como a urease de fonte vegetal, e podem ser usadas por uma semana. Outras enzimas impuras têm atividade muito baixa para poderem ser utilizadas sem purificação, como muitas decarboxilases comerciais.

3ª *Imobilização da enzima* – dos métodos de imobilização, os mais empregados na construção de biossensores têm sido:⁴ o do suporte com ligação covalente, o da ligação covalente cruzada e o da oclusão.

No método do suporte com ligação covalente, a enzima é mantida num ambiente semelhante ao que ela está na natureza e devido a isto ela possui maior estabilidade frente aos efeitos de pH, força iônica, solventes e temperatura. O método de ligação química com glutaraldeído, por exemplo, um dos mais utilizados, está representado, esquematicamente, a seguir:



O suporte com grupos NH_2 livres (esferas de vidro, membranas de colágeno ou intestino de porco, etc...) é ativado com glutaraldeído e em seguida o produto formado é acoplado com grupos NH_2 livres, da enzima. Desse modo obtém-se uma camada rígida de enzima imobilizada, muito estável por vários meses permitindo a realização de centenas de análises.

O método da ligação cruzada intermolecular baseia-se também na formação de ligações químicas, porém na ausência de suporte. Reagentes bi ou multifuncionais (glutaraldeído; 2-isocianato-4-isotiocianato tolueno; 2,4-biscloroeto sulfonil fenol; etc. são empregados para imobilizar enzimas através de ligações cruzadas intermoleculares, com a formação concomitante de moléculas macroscópicas.

O método da oclusão em gel consiste no confinamento da enzima nos espaços intersticiais de polímeros (agar, carragenatos, poliacrilamida, álcool polivinílico) ou de membranas semipermeáveis.

4ª *Colocação da enzima imobilizada no sensor adequado* – a enzima imobilizada é acoplada à base de um sensor eletroquímico adequado, que responda a um dos reagentes A ou B na equação 2 ou a um dos produtos C ou D:



O sensor pode ser um eletrodo seletivo de gás, para medida do consumo de O_2 ou da liberação de NH_3 ou CO_2 ; um eletrodo de vidro, para reações que liberam H^+ ou NH_4^+ ; um eletrodo de Pt ou C, para seguir reações envolvendo espécies eletroativas ou outros tipos de eletrodos seletivos, como de CN^- para determinação de amigdalina, eletrodo de I^- para enzimas oxidativas, eletrodo de S^{2-} para determinação de colinesterase. Portanto o fator limitante para construção de um eletrodo enzimático reside na disponibilidade do sensor eletroquímico para monitorar a reação.

3. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DOS ELETRODOS ENZIMÁTICOS

É muito difícil definir a estabilidade de um eletrodo enzimático, pois uma enzima pode perder um pouco de sua atividade, ocasionando um deslocamento da curva de calibração para baixo. Entretanto se o coeficiente angular permanecer constante, como acontece frequentemente, o eletrodo ainda é utilizável, precisando somente de calibração diária. Outro problema reside no fato de muitos autores medirem o potencial de seus eletrodos ocasionalmente, após longos períodos de tempo e relatarem esses dados como estabilidade. Isto pode significar que o eletrodo foi usado uma vez por dia ou por semana, dez vezes por dia ou centenas de vezes. Naturalmente, quanto maior o uso, menor será a vida útil.

O primeiro fator que afeta a estabilidade é o tipo de imobilização. Assim, eletrodos com enzimas ocluídas em polímeros de poliacrilamida duram três semanas ou 50-90 análises. Já aqueles, por exemplo, com glicose oxidase imobilizada quimicamente, podem ser usados por 14 meses, ou entre 200-1000 análises. Finalmente, a estabilidade dependerá da base do sensor; geralmente, este tem uma estabilidade maior do que a do eletrodo enzimático e não se constitui em fator limitante.

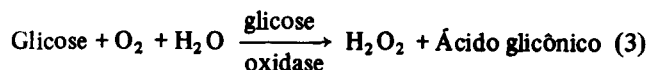
O tempo de resposta de um eletrodo enzimático é afetado por vários fatores, tais como: velocidade de agitação da solução, concentração do substrato, concentração da enzima, pH e temperatura.

É importante lembrar que o pH ótimo de uma enzima imobilizada não é necessariamente o mesmo da enzima solúvel. Além disso, o pH requerido pelo eletrodo íon-seletivo quando usado como base, pode não ser compatível com o exigido pela enzima. A experiência orienta no sentido de adequar o pH de acordo com as necessidades da enzima e não do eletrodo.

4. EXEMPLOS DE ELETRODOS ENZIMÁTICOS

A primeira referência de um eletrodo de enzima surgiu com o trabalho de Clark e Lyons⁵ que determinaram glicose, amperométricamente, usando glicose oxidase imobiliza-

da dentro de membranas de cuprofane e acoplada a um eletrodo de oxigênio:



O decréscimo na pressão parcial do oxigênio era equivalente ao conteúdo de glicose no sangue e no plasma.

Na França, Pierre Coulet⁶ e colaboradores do Laboratório de Biologia e Tecnologia de Membrana, Universidade Claude Bernard, desenvolveram sensores para glicose, muito estáveis e sensíveis, que utilizam membranas de colágeno contendo a enzima.

Em fevereiro de 1988, a Universal Sensors, New Orleans, Estados Unidos, lançou dois novos eletrodos enzimáticos, um para determinação de salicilato e outro para oxalato, baseados em pesquisas desenvolvidas inicialmente no Brasil.^{7,8}

A Tabela I apresenta alguns dos eletrodos enzimáticos mais importantes.

Tabela I. Principais eletrodos enzimáticos disponíveis comercialmente

| Tipo | Enzima | Sensor | Referência |
|-------------|--|-------------------------------------|------------|
| Glicose | Glicose oxidase E.C.1.1.3.4 | Pt (H ₂ O ₂) | 9 |
| | | O ₂ | 14 |
| | | I | 15 |
| Uréia | Urease E.C.3.5.1.5 | NH ₃ | 16 |
| | | NH ₄ ⁺ | 17 |
| Ácido Úrico | Uricase E.C.1.7.3.3 | O ₂ | 18 |
| Álcool | Álcool oxidase E.C.1.1.3.13 | O ₂ | 19 |
| | | | |
| L.Tirosina | Tirosina decarboxilase E.C.4.1.1.25 | CO ₂ | 20 |
| Oxalato | Oxalato oxidase E.C.1.2.3.4 | O ₂ | 8 |
| | | | |
| Salicilato | Salicilato hidroxilase E.C. | O ₂ | 7 |
| Creatinina | Creatinase E.C.3.5.4.21 | NH ₃ | 21 |
| | | | |
| Ascorbato | Ascorbato oxidase E.C.1.10.3.3 | O ₂ | 22 |
| L. Lisina | Lisina decarboxilase E.C.4.1.1.18 | CO ₂ | 23 |
| Açúcar | Invertase/Mutarotase/ Glicose oxidase E.C.3.2.1.26/5.1.3.3/ 1.1.3.4 | Pt (H ₂ O ₂) | 24 |
| | | O ₂ | 25 |
| | | | |
| Lactato | Lactato dehidrogenase E.C.1.1.2.3 | O ₂ | 26 |
| | | C (NADH) | 27 |
| Penicilina | Penicilinase E.C.3.5.3.6 | pH | 28 |
| | | | |

5. BIOSSENSORES QUE UTILIZAM CÉLULAS MICROBIANAS OU ENZIMAS DE TECIDOS

A aplicação de células microbianas ou de tecidos, à superfície de um eletrodo para formar um sensor bio-seletivo, se constitui numa das áreas mais interessantes do campo de eletrodos biológicos. O primeiro eletrodo potenciométrico microbiano surgiu com o trabalho de Divies¹⁰. Excelen-

tes revisões desta área foram escritas por Suzuki¹¹ e Rehnitz¹².

O uso de células microbianas oferece três vantagens principais a saber:

1. Não são necessárias enzimas purificadas;
2. O eletrodo pode ser regenerado por imersão no meio nutriente. Células bacterianas, por exemplo, podem ser alimentadas e mantidas vivas por longos períodos.
3. As células intactas podem conter muitas enzimas e vários cofatores que podem catalisar inúmeras transformações, difíceis ou impossíveis, com simples enzimas imobilizadas.

Por outro lado, algumas desvantagens aparecem, tais como: pobre seletividade, uma vez que podem estar presentes várias enzimas e tempo de resposta longo, devido a baixa concentração da enzima ou espessura exagerada da membrana do eletrodo.

6. ELETRODOS IMUNOSSENSORES

A ligação de uma enzima diretamente a um antígeno ou anticorpo ou a imobilização direta de um antígeno ou anticorpo a um suporte, como vidro ou membrana de colágeno, pode ser efetuada facilmente como num imunensaio enzimático.

Aizawa e Suzuki¹³ descreveram um imunossensor para sífilis, imobilizando o antígeno de reatividade imunológica para o anticorpo de "Wasserman", dentro de uma membrana de acetato de celulose. Esta foi usada em conjunto com um par de eletrodos prata/cloreto de prata. O potencial assimétrico desenvolvido era dependente da concentração do anticorpo, ou seja, para soro positivo "Wasserman".

7. DISPONIBILIDADE COMERCIAL

Atualmente existem vários aparelhos comerciais que usam enzimas imobilizadas acopladas a sensores eletroquímicos.

Assim, a Owens (americana) comercializa instrumentos para análise de uréia e glicose; a YellowSpring Instrument (americana) fabrica analisadores para glicose, triglicerídeos, lipase, colesterol.

Outras companhias como a Fuji Electric (japonesa), Tacussel (francesa) e a Universal Sensors (americana), oferecem unidades de eletrodos enzimáticos.

8. CONSIDERAÇÕES ECONÓMICAS

Deve-se, inicialmente, reconhecer que o campo dos sensores enzimáticos é dominado pelas aplicações em análises clínicas. Apenas nos últimos anos, algumas indústrias brasileiras de açúcar e álcool, demonstraram interesse no emprego de eletrodos enzimáticos.

Em países europeus e nos Estados Unidos esses eletrodos são usados em medidas contínuas de glicose, lactato, uréia, ácido úrico, em laboratórios de emergência e monitoramento de pacientes de unidades de terapia intensiva.

Acredita-se que a probabilidade de um biossensor enzimático tornar-se bem estabelecido no mercado dependerá da sua relevância industrial e sobretudo da sua praticabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Guilbault, G.G.; Oliveira Neto, G.; "Enzyme, Microbial and Immunochemical Electrodes Probes" in "Enzymes and Immobilised Cells in Biotechnology"; Allen I. Laskin, Ed.; The Benjamin/Cummings Publ. Comp., California (1985).
- ² Wingard Jr., L.B.; "Electrochemical Techniques with Immobilised Biological Materials", in "Immobilised cells and enzymes, a practical approach", Woodward Ed., IRL Press, Oxford (1985).
- ³ Kulys, J.J.; *Biosensors*, (1986), 2, 3.
- ⁴ Guilbault, G.G.; "Analytical uses of immobilized enzymes", Marcel Dekker, Inc, New York (1984).
- ⁵ Clark, L.C.; Lyons, C.; *Ann. N.Y. Acad. Sci* (1962), 102, 29.
- ⁶ Coulet, P.R.; Gautheron, D.C.; Bertrand, C.; *Anal. Chim. Acta* (1981), 126, 23.
- ⁷ Rahni, M.N.; Guilbault, G.G.; Oliveira Neto, G.; *Anal. Chim. Acta* (1986), 181, 219.
- ⁸ Rahni, M.N.; Guilbault, G.G.; Oliveira Neto, G.; *Anal. Chem.* (1986), 58, 523.
- ⁹ Tschida, T.; Yoda, K.; *Enzyme Microbiol. Technol.* (1981), 3, 326.
- ¹⁰ Divies, C.; *Chem. Eng. News*, (1976), 54, 23.
- ¹¹ Suzuki, S.; Satoh, I.; Karube, I.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* (1982), 7, 147.
- ¹² Rechnitz, G.; *Science*, (1981), 214, 287.
- ¹³ Aizawa, M.; Suzuki, S.; *Chem. Lett.* (1977) 7, 779.
- ¹⁴ Updike, S.J.; Shults, M.C.; Bushby, M.; *J. Lab. Clin. Med.*, (1979), 93, 518.
- ¹⁵ Nagy, G.; Von Storp, L.H.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chim. Acta* (1973), 66, 443.
- ¹⁶ Mascini, M.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chem.* (1977), 49, 795.
- ¹⁷ Schindler, J.G.; Gülich, M.; *Biomed. Technik*, (1981), 26, 43.
- ¹⁸ Guilbault, G.G.; Nanjo, M.; *Anal. Chem.* (1974), 73, 367.
- ¹⁹ Nanjo, M.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chim. Acta* (1975), 75, 169.
- ²⁰ Havas, J.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chem.*, (1982), 54, 1991.
- ²¹ Guilbault, G.G.; Coulet, P.; *Anal. Chim. Acta*, (1983), 152, 223.
- ²² Matsumoto, K.; Yamada, K.; Osajima, Y.; *Anal. Chem.* (1981), 53, 1974.
- ²³ White, W.C.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chem.* (1978), 50, 1481.
- ²⁴ Coulet, P.R.; Bertrand, C.; *Anal. Lett.* (1979), 12, 581.
- ²⁵ Satoh, I.; Karube, J.; Suzuki, S.; *Biotechnol. Bioeng.* (1976), 18, 269.
- ²⁶ Cheng, F.; Christian, G.; *Clin. Chim. Acta*, (1979), 91, 295.
- ²⁷ Yao, T.; Musha, S.; *Anal. Chim. Acta*, (1979), 110, 203.
- ²⁸ Enfors, S.; Nilsson, H.; *Enzyme Microb. Technol.* (1979) 1, 260.
- ²⁹ Turner, A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S.; Eds; "Biosensors: Fundamental and Applications"; Oxford University Press, Oxford (1987).

DIVULGAÇÃO

MICROCALORIMETRIA BIOLÓGICA – PARTE II – USOS E APLICAÇÕES DA MICROCALOMETRIA NA MONITORAÇÃO E ESTUDO TERMODINÂMICO E ANALÍTICO DE SISTEMAS DE NATUREZA BIOLÓGICA.

Pedro L.O. Volpe

Instituto de Química – UNICAMP; C. Postal 6154; 13083 – Campinas (SP)

Recebido em 4/5/88

ABSTRACT

It is intention to review biocalorimetrics work. Of the purely thermodynamic studies, only a few representative examples are discussed, whereas more complete coverage is given of the general analytical studies. Microcalorimetric

studies on biological systems and on impure biochemical preparations have their main interest as general analytical experiments. Such applications are presently being developed into what are believed to be important experimental techniques in basic biology, as well as in applied areas like, fermentation, microorganism growing, biological response,