

## IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS A PARTIR DE “KIT” COMERCIAL: DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS EM SANGUE ANIMAL EMPREGANDO MULTICOMUTAÇÃO EM FLUXO

Cherrine Kelce Pires e Boaventura Freire dos Reis\*

Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Av. Centenário, 303, 13400-970 Piracicaba - SP

Recebido em 23/3/04; aceito em 4/10/04; publicado na web em 2/2/05

ENZYME IMMOBILIZATION USING A COMMERCIAL KIT: DETERMINATION OF METABOLIC PARAMETERS IN ANIMAL BLOOD EMPLOYING A MULTICOMMUTATION FLOW SYSTEM. Automatic flow procedures based on the multicommutation concept, dedicated to the determination of 3-hydroxybutyrate, glucose and cholesterol are proposed. The enzymes were immobilized on glass beads and packed into mini-columns that were coupled to a flow system. Sampling throughputs of 55, 40 and 40 determinations per hour, linear response from 10 to 150, 50 to 600, 25 to 125 mg L<sup>-1</sup>, detection limits of 1.5, 14 and 4 mg L<sup>-1</sup> and relative standard deviations of 1, 2 and 2% for 3-hydroxybutyrate, glucose and cholesterol, respectively, were achieved.

Keywords: enzymatic reactions; flow injection analysis; commercial kit.

### INTRODUÇÃO

O estado nutricional dos animais tem forte influência na produtividade e pode ser avaliado a partir de alguns constituintes bioquímicos do sangue animal. Neste sentido, Payne e Payne<sup>1</sup> sugerem a elaboração de um perfil metabólico, o qual consiste na determinação dos teores de alguns constituintes bioquímicos encontrados no sangue dos animais. De acordo com Ekman<sup>2</sup>, através do perfil metabólico é possível investigar as possíveis relações entre alimentação, constituintes sanguíneos e performance do animal. Dentre as espécies bioquímicas necessárias para traçar o perfil metabólico do estado nutricional dos animais destacam-se 3-hidroxi-butarato, glicose e colesterol<sup>3-5</sup>.

O 3-hidroxi-butarato é uma das principais fontes de energia para os animais, ajudando na digestão da celulose, além do fornecimento de energia para a movimentação do animal. Assim, o 3-hidroxi-butarato é um importante parâmetro no estado de desnutrição do animal<sup>6</sup>. A glicose é um indicador plasmático de metabolismo energético e, em vista disso, sua determinação tem grande importância no acompanhamento do estado de saúde do animal<sup>4</sup>. A determinação de colesterol é requerida em diagnósticos clínicos como importante parâmetro na avaliação das funções hepáticas do animal<sup>5</sup>.

Os métodos para a determinação de constituintes bioquímicos encontrados no sangue, geralmente, são baseados em “kits” disponíveis no mercado. Neste caso, as metodologias utilizadas são manuais, o que torna os procedimentos morosos e dispendiosos. Estas dificuldades podem ser minimizadas empregando procedimentos automáticos baseados no processo de análise química em fluxo (FIA)<sup>7-9</sup>.

Procedimento analítico baseado no processo FIA permite processar grande número de amostras em pouco tempo, e reduzir o emprego de vidraria. Além disso, tem a vantagem de ser um sistema fechado, o que minimiza os riscos de contaminação da amostra e, também, proporciona maior segurança para o operador<sup>10,11</sup>.

Os procedimentos mais eficientes para a determinação de 3-hidroxi-butarato, glicose e colesterol em sangue de animal são baseados em reações enzimáticas em solução<sup>12,13</sup> ou imobilizadas em esferas de vidro<sup>14-16</sup>.

Na determinação de 3-hidroxi-butarato, de glicose e de colesterol, as enzimas 3-hidroxi-butarato desidrogenase, glicose oxidase, colesterol esterase e oxidase são as mais utilizadas. Estas enzimas não se encontram disponíveis no mercado nacional e a aquisição via importação demora de 60 a 90 dias. Em geral, os métodos de referência empregam procedimentos manuais e utilizam “kits” comerciais, os quais compreendem a enzima e os demais componentes necessários à detecção espectrofotométrica. Estes “kits” têm um valor comercial em torno de 1/3 do preço da enzima correspondente e são encontrados no mercado nacional.

Neste trabalho foi investigada a viabilidade de imobilização das enzimas 3-hidroxi-butarato desidrogenase, glicose oxidase e colesterol esterase e oxidase para a determinação de 3-hidroxi-butarato, glicose e colesterol em soro de sangue de animais utilizando “kits” comerciais. Os módulos de análises para implementar os procedimentos analíticos foram baseados no processo de multicommutação em fluxo<sup>17,18</sup>, o qual apresentou meios para se desenvolver procedimentos automáticos de alto desempenho empregando instrumentação de baixo custo.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Equipamentos e acessórios

Os equipamentos utilizados foram um espectrofotômetro Femto, modelo 700 Plus, equipado com uma cela para detecção quimi-luminescente e outra para detecção espectrofotométrica UV-Vis; uma bomba peristáltica (Ismatec, IPC-8) equipada com tubos de bombeamento de Tygon®; quatro válvulas solenóides de três vias (Nresearch 161T031); um microcomputador 586 equipado com interface de controle (PCL-711S, American Advantech Corp); quatro mini-colunas confeccionadas em acrílico (15 mm x 5 mm); tubos de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm para construção de bobinas de mistura e linhas de fluxo e conectores em acrílico em formato “T”.

Para o preparo de amostras e soluções de referência foram utilizados centrífuga Centra - 7R, pipetadores automáticos para microvolumes, ponteiros de micropipetas para volumes entre 20 e 5000 µL e tubos de ensaio com volume interno de 10 mL.

\*e-mail: reis@cena.usp.br

## Reagentes e soluções

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

### Determinação de 3-hidroxiacetato

Solução estoque  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de 3-hidroxiacetato foi preparada, dissolvendo-se 0,5 g de 3-hidroxiacetato em água. Soluções de referência contendo 10, 25, 50, 75, 100, 125 e  $150 \text{ mg L}^{-1}$  de 3-hidroxiacetato foram preparadas em água por diluições apropriadas da solução estoque e mantidas sob refrigeração à  $5^\circ\text{C}$ .

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

Solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de glicina foi preparada dissolvendo-se 0,75 g de glicina em 100 mL de água.

Solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,0) foi preparada dissolvendo-se 13,6 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em água. O valor de pH foi ajustado com solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH e o volume foi completado para 1000 mL.

### Determinação de glicose

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

Solução  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de 5-amino-2,3-di-hidroftolazina-1,4-diona (luminol) foi preparada, dissolvendo-se 0,0443 g de luminol em 100 mL de solução  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{CO}_3$ , com pH ajustado para 10,5 com solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  HCl. Esta solução foi armazenada em frasco âmbar e mantida sob refrigeração à  $5^\circ\text{C}$ .

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

Solução  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (pH 10,5) foi preparada, dissolvendo-se 13,821 g de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  em água. O pH foi ajustado com solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de HCl e o volume completado para 500 mL com água.

Soluções  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foram preparadas, dissolvendo-se 13,6 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em água. Os valores de pH foram ajustados para 6,0 e 7,0 adicionando-se solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH e o volume foi completado para 1000 mL com água.

### Determinação de colesterol

Solução estoque  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de colesterol foi preparada, dissolvendo-se 0,5 g de colesterol em uma mistura contendo 12,5 mL isopropanol e 12,5 mL Triton X-100. A mistura foi aquecida lentamente até  $40^\circ\text{C}$ . Após a dissolução, o volume foi completado para 500 mL com água e a solução armazenada em frasco de polietileno. Mantida sob refrigeração à  $5^\circ\text{C}$ , esta solução foi usada durante um mês. Soluções de referência contendo 25, 50, 75, 100 e  $125 \text{ mg L}^{-1}$  de colesterol foram preparadas em solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,5), por diluições apropriadas da solução estoque. Estas soluções foram preparadas semanalmente e mantidas sob refrigeração à  $5^\circ\text{C}$ .

As soluções de luminol, hexacianoferrato (III), solução  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e solução  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foram preparadas, conforme citadas para a determinação de glicose.

As enzimas foram imobilizadas em esferas de vidro funcionalizadas com aminopropil<sup>14,16</sup>, usando parte das soluções dos “kits” comerciais Sigma “Diagnostics”<sup>19</sup>, Labtest Diagnóstica<sup>20</sup> e Labtest

Diagnóstica<sup>21</sup> para as determinações de 3-hidroxiacetato, glicose e colesterol, respectivamente. Para comparação dos resultados foram utilizados os mesmos “kits” e as amostras foram processadas de acordo com as instruções do fabricante.

## Imobilização das enzimas

As soluções do “kit” contendo as enzimas HBDH, GOD, CE e COD foram imobilizadas “off line” em esferas de vidro tratadas com aminopropil (Sigma, G-4518), com porosidade de 170 Å e 200-400 mesh. Os procedimentos para a imobilização são descritos a seguir. Para os três analitos, a imobilização foi efetuada utilizando 2,0 mL da respectiva solução de enzima que compunha o “kit”.

### Imobilização do 3-hidroxiacetato desidrogenase

A solução contendo a enzima 3-hidroxiacetato desidrogenase foi imobilizada em uma massa de aproximadamente 0,1 g de esferas de vidro, seguindo procedimento relatado em trabalhos anteriores<sup>14,22</sup>. Uma solução 2% (v/v) de glutaraldeído em solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,0) foi adicionada em um béquer contendo as esferas de vidro e deixada em repouso durante 3 h em temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ). Após essa etapa, as esferas foram lavadas com água desgasificada. A solução da enzima 3-hidroxiacetato desidrogenase foi colocada em contato com as esferas durante 6 h.

### Imobilização da glicose oxidase, colesterol esterase e colesterol oxidase

As enzimas glicose oxidase, colesterol esterase e colesterol oxidase foram imobilizadas separadamente em esferas de vidro, conforme descrito na literatura<sup>15,16,23</sup>. Uma massa de aproximadamente 0,1 g de esferas de vidro foi lavada com água e, posteriormente, com solução  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (pH 10,5). Após esta etapa, as esferas de vidro foram mantidas em solução 5% (v/v) de glutaraldeído durante 2 h sob agitação. Em seguida, as esferas foram filtradas e lavadas seqüencialmente com água e solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,0).

Posteriormente, as esferas de vidro foram mantidas em 2,0 mL de solução contendo as enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase, durante 2 h à  $5^\circ\text{C}$ . Após esta etapa, as esferas foram mantidas durante 2 h em solução de cianoborodireto de sódio à temperatura de  $5^\circ\text{C}$ , e durante 1 h em solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de glicina à  $25^\circ\text{C}$ . Em seguida, as esferas foram lavadas com água e solução  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,5). O mesmo procedimento foi seguido para a imobilização da glicose oxidase utilizando 2 mL da solução do “kit”.

Após a imobilização, as esferas de vidro foram acondicionadas em mini-colunas de acrílico (15 mm x 5 mm d.i.), utilizando-se uma seringa. Após o preenchimento, a coluna foi imersa em solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,0) e mantida sob refrigeração à  $5^\circ\text{C}$ .

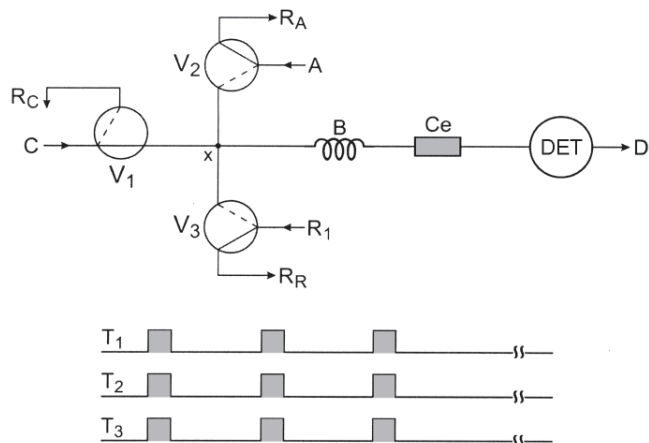
## Preparo das amostras

Para a obtenção do soro, as amostras de sangue foram coletadas da veia jugular dos animais, utilizando-se agulhas de calibre 18 para prevenir hemólise. As amostras foram recolhidas em tubos de ensaio tipo Vacutainer® (10 mL). Após a coleta, o tubo foi invertido cuidadosamente e deixado em repouso durante 24 h à temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ), para que ocorresse a coagulação e a separação do soro. Após essa etapa, um volume de 4 mL de soro sanguíneo foi transferido para outro tubo, utilizando-se um pipetador automático. Os tubos contendo o soro foram centrifugados durante 10 min a 2500 rpm. Estas amostras foram mantidas sob refrigeração.

## Descrição dos procedimentos propostos

### Determinação de 3-hidroxiacetato

Na Figura 1 é mostrado o diagrama de fluxos do módulo de análises empregado para a determinação de 3-hidroxiacetato. Nesta configuração as válvulas solenóides  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$  estão desligadas e a solução transportadora (C) está fluindo através da bobina de mistura (B) e da coluna enzimática (Ce), em direção ao espectrofotômetro (DET). As soluções da amostra (A) e do reagente ( $R_1$ ) estão sendo bombeadas para os respectivos reservatórios ( $R_a$ ,  $R_r$ ).



**Figura 1.** Diagrama de fluxos do módulo de análises empregado para a determinação de 3-hidroxiacetato.  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$  - válvulas solenóides de três vias, A - amostra (vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup>), C - carregador, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0 (vazão de 1,4 mL min<sup>-1</sup>), R - reagente NAD<sup>+</sup>, 7,0 mmol L<sup>-1</sup> (vazão de 1,4 mL min<sup>-1</sup>),  $R_c$ ,  $R_a$  e  $R_r$  - reservatórios, x - ponto de confluência, Ce - coluna enzimática, B - bobina de mistura (0,8 mm d.i., 30 cm), DET - detector espectrofotométrico ( $\lambda = 340$  nm), D - descarte. A linha sólida e tracejada no símbolo de cada válvula indica o caminho do fluído quando a válvula está desligada ou ligada, respectivamente. As setas indicam a direção de bombeamento.  $T_1$ ,  $T_2$  e  $T_3$  - tempo de acionamento das válvulas  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$ . A superfície sombreada no diagrama de tempo indica que a respectiva válvula está ligada

O módulo de análises foi projetado para implementar o processo de multicomutação em fluxo, e o programa de controle e aquisição de dados foi desenvolvido baseado neste conceito. Assim, quando o programa foi iniciado, o computador enviava através da porta de saída da interface PCL711S uma seqüência de pulsos elétricos para acionar as válvulas  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$ . A seqüência de acionamento das válvulas é mostrada no diagrama de tempos da Figura 1.

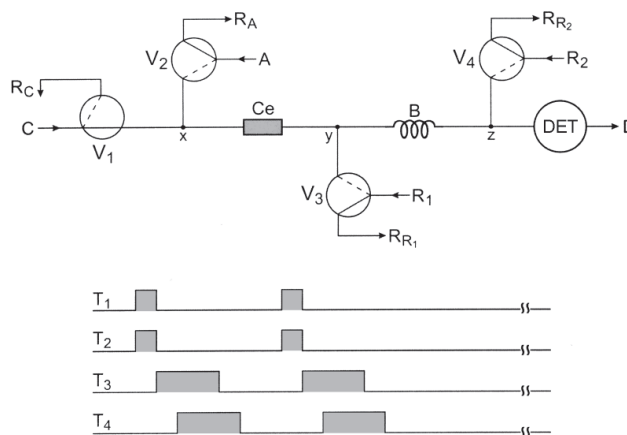
O diagrama de tempos da Figura 1 mostra que na etapa de amostragem as válvulas  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$  foram acionadas simultaneamente. Nesta configuração, a solução transportadora foi desviada do percurso analítico para seu reservatório ( $R_c$ ), enquanto que as soluções da amostra (A) e do reagente ( $R_1$ ) fluíam através das válvulas  $V_2$  e  $V_3$ , misturando-se a partir da confluência (x). Neste módulo de análises, os volumes das soluções da amostra e do reagente inseridos na bobina de mistura foram em função dos tempos de acionamento das válvulas e das vazões de bombeamento. As vazões foram mantidas constantes (Figura 1), e o intervalo de tempo de acionamento simultâneo foi fixado em 10 s. Após a introdução das soluções, as válvulas foram desligadas e as soluções voltavam à condição inicial. A solução transportadora deslocava a zona da amostra através da bobina de mistura (B) e da coluna enzimática (Ce) para o detector (DET). As reações de oxidação do 3-hidroxiacetato e redução do NAD<sup>+</sup> ( $R_1$ ) ocorriam durante a passagem da zona da amostra pela coluna enzimática. A concentração

de NADH gerada pela reação enzimática é proporcional à concentração de 3-hidroxiacetato, que foi monitorada em 340 nm.

Os experimentos foram realizados usando soluções de referência entre 10 e 150 mg L<sup>-1</sup> de 3-hidroxiacetato e amostras de soro sanguíneo. Estes foram repetidos durante vários dias para verificar a resposta da enzima e avaliar a vida útil da coluna. As amostras também foram analisadas empregando-se o procedimento manual para permitir a verificação da exatidão dos resultados obtidos com o procedimento proposto.

### Determinação de glicose e colesterol

Os procedimentos para determinação de glicose e colesterol foram baseados em detecção por quimiluminescência<sup>15,16</sup>, empregando-se módulo de análises baseado em multicomutação, mostrado no diagrama da Figura 2. Nesta configuração, as válvulas  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$  e  $V_4$  estão desligadas, e a solução transportadora (C) está fluindo através da bobina de reação (B) e da coluna enzimática (Ce) em direção ao detector (DET).



**Figura 2.** Diagrama de fluxos do módulo de análises para a determinação de glicose ou colesterol.  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$  e  $V_4$  - válvulas solenóides de três vias, A - amostra (vazão de 1,4 mL min<sup>-1</sup>), C - carregador, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,5 (vazão de 2,1 mL min<sup>-1</sup>),  $R_1$  - solução 2,5 mmol L<sup>-1</sup> de luminol, pH 10,5 (vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup>),  $R_2$  - solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de hexacianoferrato (III) (vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup>), x, y e z - pontos de confluência, B - bobina de mistura (0,8 mm d.i., 75 cm), DET - detector quimiluminescente, D - descarte. Os demais parâmetros são iguais aos da Figura 1

Para a detecção quimiluminescente foi utilizado um espectrofotômetro convencional, onde o feixe de radiação foi bloqueado e uma cela de fluxo para quimiluminescência<sup>24</sup> foi posicionada a 2 mm da fenda de entrada do detector.

O módulo de análises foi controlado pelo computador empregando um "software" escrito em linguagem Quick BASIC 4.5. O acionamento das válvulas solenóides para inserção das soluções segue a estratégia esquematizada no diagrama de tempos de acionamento das válvulas (Figura 2). Durante o acionamento das válvulas  $V_1$  e  $V_2$ , o fluxo da solução transportadora foi interrompido, e a solução da amostra foi introduzida no percurso analítico no ponto de confluência (x). Após a etapa de inserção da alíquota da solução da amostra, as válvulas  $V_1$  e  $V_2$  foram desligadas e a solução da amostra foi transportada através da coluna enzimática (Ce) onde ocorria a reação. Em seguida, a inserção dos reagentes  $R_1$  e  $R_2$  na zona da amostra foi efetuada, acionando as válvulas  $V_3$  e  $V_4$  na seqüência indicada no diagrama de tempo de acionamento destas duas válvulas. A reação entre o luminol e o produto da reação enzimática ocorreu durante o transporte da zona da amostra através do reator B. O ponto de confluência para adição da solução do

catalisador ( $R_2$ ) foi instalado a 10 mm da entrada da cela de fluxo. Esta montagem visava um melhor aproveitamento da radiação emitida, em vista disso, a válvula  $V_4$  foi acionada com um retardo de 5 s após o acionamento de  $V_3$ .

O módulo de análises foi desenvolvido para permitir a determinação de glicose e de colesterol, necessitando apenas a troca da coluna enzimática, assim, a forma de funcionamento foi a mesma para ambos analitos. Os experimentos para definir os tempos de acionamento das válvulas foram realizados usando soluções de referência entre 50 e 600 mg L<sup>-1</sup> de glicose, e entre 25 e 125 mg L<sup>-1</sup> de colesterol.

Para verificar o desempenho do sistema, a vida útil das colunas de enzimas, a precisão e a exatidão dos resultados foram determinadas concentrações de glicose e de colesterol em amostras de soro animal.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para verificar a possibilidade de imobilização das enzimas a partir de “kits” comerciais, foram efetuados estudos empregando módulos de análises baseados em multicomutação. As vazões das soluções, as dimensões do reator e da coluna enzimática foram mantidas constantes.

### 3-hidroxibutirato

Na determinação de 3-hidroxibutirato, a influência do volume da amostra foi avaliada variando-se o tempo de acionamento da válvula  $V_2$  (Figura 1) e os resultados são mostrados na Tabela 1. Observou-se que os sinais aumentavam até o intervalo de tempo de 10 s, decrescendo para tempos maiores. O tempo de 10 s foi selecionado, tendo em vista que, além de fornecer a melhor magnitude de sinal, os resultados apresentavam o menor erro relativo (0,5%).

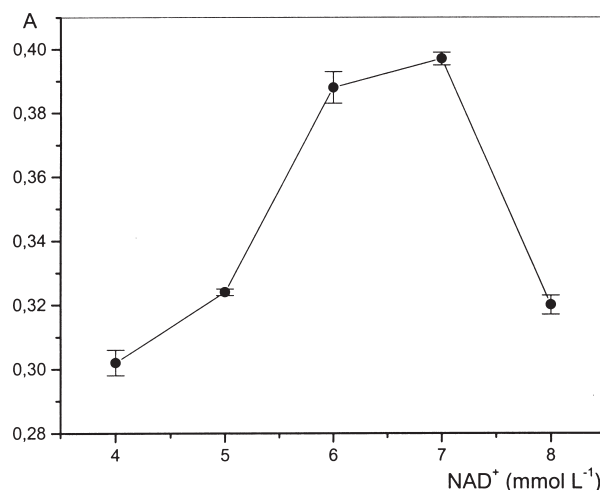
**Tabela 1.** Variação do tempo de acionamento da válvula  $V_2$

Tempo(s)	Volume( $\mu$ L)	Sinal(A)
1	20	0,191 $\pm$ 0,004
4	80	0,282 $\pm$ 0,005
7	140	0,313 $\pm$ 0,003
10	200	0,351 $\pm$ 0,001
13	260	0,295 $\pm$ 0,009
16	320	0,273 $\pm$ 0,010
19	380	0,211 $\pm$ 0,012

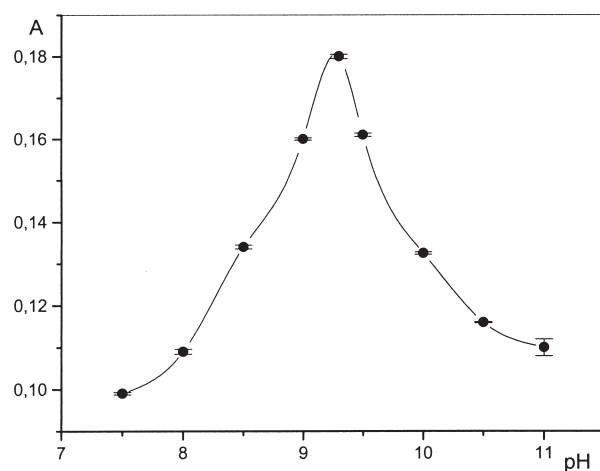
A concentração do reagente  $NAD^+$  foi estudada na faixa entre 4 e 8 mmol L<sup>-1</sup> e os resultados estão mostrados na Figura 3. Pode-se observar nesta figura o aumento da magnitude do sinal até a concentração de 7 mmol L<sup>-1</sup> e posteriormente, o decréscimo do sinal analítico. A diminuição do sinal para a concentração de 8 mmol L<sup>-1</sup> nos leva à suposição de que o excesso da coenzima inibe a atividade da enzima imobilizada. Este resultado é concordante ao observado por Pires e colaboradores<sup>14</sup> e Kiba e colaboradores<sup>22</sup>, onde a imobilização foi efetuada a partir de enzima pura.

De acordo com a literatura<sup>25,26</sup>, o pH e a temperatura influenciaram fortemente o desenvolvimento das reações enzimáticas. A influência da concentração hidrogeniônica na atividade enzimática foi avaliada pela mudança de pH da solução do reagente  $NAD^+$  na faixa entre 7,5 e 11,0 usando solução de glicina. Na Figura 4 pode-se observar um aumento do sinal até pH 9,3. Deste modo, este pH foi selecionado para posteriores estudos.

A influência da temperatura na reação enzimática foi avaliada



**Figura 3.** Influência da concentração do reagente  $NAD^+$ ,  $n=3$ . Resultados obtidos empregando-se o sistema da Figura 1



**Figura 4.** Influência da concentração hidrogeniônica,  $n=3$ . Estudo realizado com o sistema da Figura 1

mantendo-se a coluna enzimática imersa em banho térmico, variando-se a temperatura entre 19 e 50 °C. Observou-se que a partir de 25 °C ocorria diminuição do sinal, chegando a uma redução de 25% quando a temperatura atingia 50 °C. Em vista disso, selecionou-se a temperatura de 25 °C (temperatura do ambiente), agregando como vantagem adicional a dispensa do banho térmico.

A estabilidade da coluna enzimática é um parâmetro importante, e foi avaliada usando solução 75 mg L<sup>-1</sup> de 3-hidroxibutirato, processando-se 8 replicatas em intervalos de 2 h. Nestas condições foram efetuadas 40 determinações por dia, e após 5 dias (200 determinações) foi observado um decréscimo de 20% na magnitude dos sinais. Inicialmente, o sinal obtido foi em torno de 0,9 abs (absorbância), portanto, após 5 dias de trabalho a enzima ainda apresentava condições de uso.

Visando comprovar a viabilidade de uso do “kit” comercial para imobilizar a enzima, analisou-se um conjunto de amostra de soro sanguíneo empregando o procedimento proposto e o manual<sup>19</sup> e os resultados são mostrados na Tabela 2. Com a análise estatística dos resultados, empregando-se o teste- $t$ <sup>27</sup>, verificou-se que não houve diferença significativa entre os resultados em nível de confiança de 95%. O limite de detecção calculado foi de 1,5 mg L<sup>-1</sup> e desvio padrão relativo de 1,0% ( $n=20$ ). Outras características favoráveis obtidas foram frequência de amostragem de 55 determi-

**Tabela 2.** Comparação de resultados

Amostra	Procedimento proposto 3-hidroxibutirato (mg L <sup>-1</sup> )	Procedimento manual 3-hidroxibutirato (mg L <sup>-1</sup> )
1	20 ± 0,2	18 ± 0,1
2	24 ± 0,3	26 ± 0,2
3	19 ± 0,1	20 ± 0,2
4	23 ± 0,2	25 ± 0,1
5	26 ± 0,1	24 ± 0,2

Resultados: média de determinações consecutivas. Valores para o Teste-*t* com 95% de confiabilidade: tabelado  $t_{95}=4,303$ , encontrado  $t=0,594$ .

nações por hora, consumo do reagente NAD<sup>+</sup>, da enzima HBDH e da amostra de 0,9 mg, 8 µg, 200 µL, respectivamente, por determinação, e geração de efluente 1,7 mL por determinação.

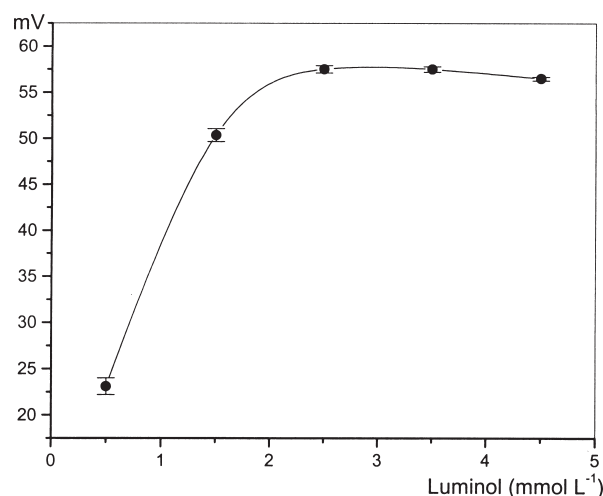
### Glicose e colesterol

Em trabalhos anteriores<sup>15,16</sup> observou-se que a temperatura ótima para o desenvolvimento da reação para os dois analitos foi em torno de 25 °C, então, foi mantido este valor para a temperatura do laboratório.

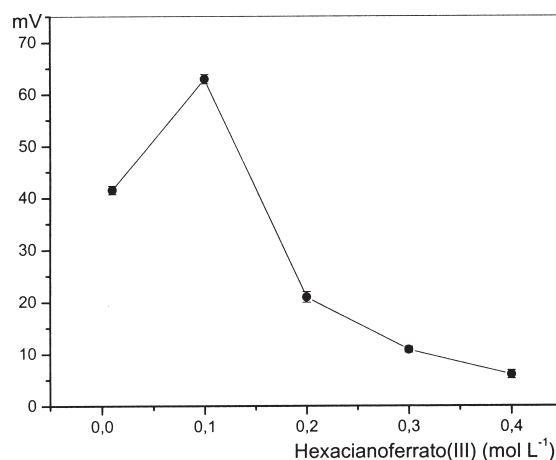
Os procedimentos para a determinação de glicose e de colesterol foram implementados empregando-se o módulo de análises representado na Figura 2. Os efeitos dos volumes das soluções da amostra e dos reagentes hexacianoferrato (III) e luminol foram avaliados variando os intervalos de tempos de acionamento das válvulas V<sub>2</sub>, V<sub>3</sub> e V<sub>4</sub>. Para estes testes foram usadas soluções de referência de 300 mg L<sup>-1</sup> de glicose e 75 mg L<sup>-1</sup> de colesterol, e os resultados são mostrados na Tabela 3. A partir destes resultados selecionou-se os intervalos de tempos de 2, 18 e 16 s para acionamento das válvulas V<sub>2</sub>, V<sub>3</sub> e V<sub>4</sub>, respectivamente, que correspondem aos volumes de 46, 360 e 320 µL. Estes valores foram escolhidos considerando-se o compromisso entre a magnitude do sinal e a precisão das medidas.

Os efeitos relacionados às concentrações dos reagentes luminol e hexacianoferrato (III) e acidez do meio foram avaliados e os resultados são mostrados nas Figuras 5, 6 e 7, respectivamente. Na Figura 5 observa-se que a partir da concentração de 2,5 mmol L<sup>-1</sup> de luminol o sinal permaneceu constante. Então, considerou-se que esta concentração foi suficiente para atender à estequiometria da reação. Observou-se na Figura 6 que o máximo de sinal foi obtido quando a concentração de hexacianoferrato (III) foi de 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

Quanto ao efeito do pH do meio reacional, a Figura 7 mostrou-se que o ótimo ocorreu em uma faixa bem estreita em torno de 7,5. Os resultados referentes aos efeitos da concentração do catalisador e da acidez do meio estão de acordo com os dados da literatura<sup>25,28</sup>. A partir destes resultados, foram selecionados como valores óti-



**Figura 5.** Influência da concentração do luminol, n=3. Estudo realizado com o sistema da Figura 2



**Figura 6.** Influência da concentração do hexacianoferrato (III), n=3. Estudo realizado com o sistema da Figura 2

**Tabela 3.** Efeitos dos volumes das soluções da amostra e dos reagentes luminol (R<sub>1</sub>) e hexacianoferrato(III) (R<sub>2</sub>) variando os intervalos de tempos de acionamento das válvulas V<sub>2</sub>, V<sub>3</sub> e V<sub>4</sub>

V <sub>1</sub> (s)	V <sub>2</sub> (s)	V <sub>3</sub> (s)	V <sub>4</sub> (s)	A(µL)	R <sub>1</sub> (µL)	R <sub>2</sub> (µL)	Glicose (mV)	Colesterol(mV)
-	1	16	12	23	320	240	33,9	59,2
-	2	16	12	46	320	240	36,6	60,5
-	3	16	12	69	320	240	35,2	58,4
-	4	16	12	92	320	240	34,1	56,8
-	2	12	12	46	240	240	34,8	57,6
-	2	16	12	46	320	240	36,7	60,5
-	2	18	12	46	360	240	40,0	62,8
-	2	22	12	46	440	240	38,3	59,7
-	2	18	12	46	360	240	40,1	62,9
-	2	18	16	46	360	320	42,5	64,0
-	2	18	18	46	360	360	39,2	60,8
-	2	18	22	46	360	440	37,5	58,5

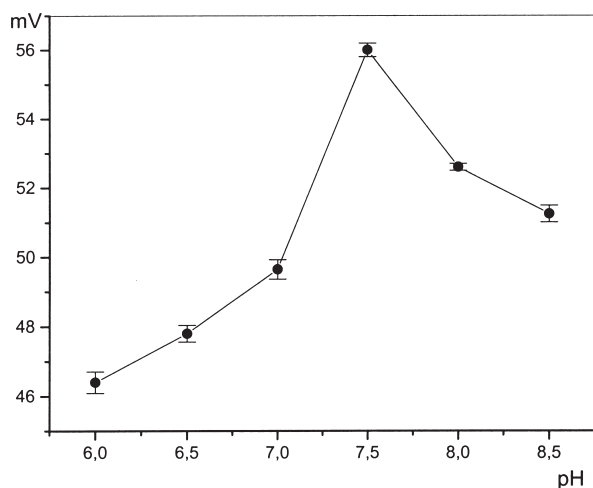


Figura 7. Influência da concentração hidrogeniônica,  $n=3$ . Estudo realizado com o sistema da Figura 2

mos: pH 7,5, concentração 2,5 mmol L<sup>-1</sup> de luminol, e concentração 0,1 mol L<sup>-1</sup> de hexacianoferrato (III).

Visando averiguar o desempenho e a vida útil da coluna de enzima imobilizada a partir de “kit” comercial, analisou-se um conjunto de amostras de soro de sangue animal, sem tratamento prévio. Estas amostras também foram analisadas empregando os procedimentos manuais Labtest Diagnóstica<sup>20</sup> e Labtest Diagnóstica<sup>21</sup> para as determinações de glicose e de colesterol, respectivamente, e os resultados são apresentados na Tabela 4. Com o resultado da análise estatística pode-se observar que não houve diferença significativa entre os resultados, em nível de confiança de 95% para os dois analitos.

A estabilidade das colunas enzimáticas para os dois analitos foi avaliada usando soluções de referência de 300 mg L<sup>-1</sup> de glicose e 75 mg L<sup>-1</sup> de colesterol. Em ambos casos, as soluções foram processadas em intervalos de 2 h e em cada teste foram efetuadas 8 determinações. Após efetuar 200 determinações foi observado um decréscimo de 18% na magnitude dos sinais, sendo que o desvio padrão relativo das medidas permanecia inferior a 2%.

Outras características analíticas tais como frequência de amostragem de 40 determinações por hora, desvio padrão relativo de 2,0% ( $n=20$ ) para os dois analitos, e consumo de reagentes de 0,2 mg de luminol e 10 mg de hexacianoferrato (III), por determinação, foram observadas.

Os volumes das soluções enzimáticas que constituíam os “kits” para determinação de glicose e colesterol foram de 500 mL e de 200 mL, respectivamente. Na parte experimental foi indicado o

uso de 2,0 mL das soluções das enzimas para efetuar cada imobilização. Desse modo, seria possível efetuar 250 e 100 imobilizações para glicose e colesterol, respectivamente, enquanto que preparando as soluções enzimáticas a partir das enzimas puras foi possível efetuar apenas 66 e 4 imobilizações para glicose e colesterol, respectivamente.

Na Tabela 5 estão reunidos os parâmetros que compõem as figuras de mérito dos três procedimentos. Estes parâmetros são comparáveis aos obtidos em trabalhos anteriores, onde a imobilização das enzimas foi efetuada usando soluções preparadas a partir de enzimas puras<sup>14-16</sup>.

## CONCLUSÃO

Os métodos automatizados propostos demonstraram que para a determinação de 3-hidroxiacetato, glicose e colesterol em soro de sangue animal, a imobilização das enzimas pode ser implementada usando-se soluções presentes em “kits” comerciais.

O período de vida útil da enzima imobilizada a partir dos “kits” foi em torno de 70% menor, em relação às enzimas preparadas a partir da enzima pura. Entretanto, a quantidade de imobilizações que podem ser feitas a partir do “kit” é significativa (100 para o colesterol e 250 para a glicose), o que é bastante compensador. Mesmo no caso do 3-hidroxiacetato em que não houve ganho na quantidade de imobilizações, houve ganho no custo de aquisição

Tabela 4. Comparação de resultados referentes às determinações de glicose e colesterol em soro sanguíneo de animal

	Procedimentos propostos (mg L <sup>-1</sup> )	Método manual (“kit”)(mg L <sup>-1</sup> )
<b>Glicose</b>		
1	190 ± 3	186 ± 7
2	135 ± 4	138 ± 8
3	132 ± 1	135 ± 3
4	208 ± 3	205 ± 4
5	171 ± 4	173 ± 3
<b>Colesterol</b>		
1	680 ± 6	674 ± 2
2	645 ± 3	649 ± 4
3	666 ± 2	671 ± 5
4	618 ± 6	610 ± 7
5	807 ± 4	813 ± 5

Resultados: média de três determinações consecutivas. Valores para o Teste-t com 95% de confiabilidade: tabelado  $t_{95} = 4,303$ , encontrados  $t$ -glicose = 0,808 e  $t$ -colesterol = 0,912.

Tabela 5. Figuras de mérito dos três procedimentos

Parâmetro	3-hidroxiacetato	Glicose	Colesterol
Consumo de enzima (U)	100	40	0,5
Consumo da co-enzima (mg)	0,9	-	-
Consumo de amostra (μL)	200	46	46
Consumo do catalisador (mg)	-	10	10
Consumo do luminol (mg)	-	0,2	0,2
Geração de efluente (mL)	1,7	2,7	2,7
Determinação por hora	55	40	40
Faixa linear (mg L <sup>-1</sup> )	10-150	50-600	25-125
	R = 0,994	R = 0,995	R = 0,993
Limite de detecção (mg L <sup>-1</sup> )	1,5	14	4
Desvio padrão relativo (%)	1,0	2,0	2,0

em torno de 30%. Além disso, a aquisição do “kit” enzimático no mercado nacional é uma vantagem operacional, considerando-se que o tempo de importação da enzima pode chegar a 90 dias.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Nutrição Animal (CENA/USP) pela concessão das amostras de sangue, à CAPES, ao CNPq e à FAPESP pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Payne, J. M.; Payne, S.; *The Metabolic Profile Test*, Oxford University Press: New York, 1987.
2. Ekman, L.; *Ann. Rech. Véter.* **1976**, *7*, 125.
3. Marshall, S. M.; Alberti, K. G. M. M.; *The Diabetes Annual*, Elsevier: Amsterdam, 1987.
4. Wittwer, F.; Contreras, P. A.; *Arch. Med. Vet.* **1980**, *12*, 180.
5. Coles, E. H.; *Veterinary Clinical Pathology*, W. B. Saunders: Philadelphia, 1980.
6. Silva, J. F.; Pannall, P. R.; *Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment*, Lloyd-Luke: London, 1984.
7. Kiba, N.; Koemado, H.; Furasawa, M.; *Anal. Chim. Acta* **1994**, *298*, 129.
8. Gorton, L.; Ogren, L.; *Anal. Chim. Acta* **1981**, *130*, 45.
9. Malik, V.; Pundir, C. S.; *Appl. Biochem.* **2002**, *35*, 191.
10. Crook, M.; *Anal. Proc.* **1993**, *22*, 165.
11. Brunner, L. A.; *J. Autom. Chem.* **1992**, *14*, 43.
12. Kronka, E. A. M.; Paim, A. P. S.; Reis, B. F.; Lima, J. L. F. C.; Lapa, R. A.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, *364*, 358.
13. Sasamoto, H.; Maeda, M.; Tsuji, A.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *310*, 347.
14. Pires, C. K.; Martelli, P. B.; Reis, B. F.; Lima, J. L. F. C.; Saraiva, M. L. M. F. S.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2457.
15. Pires, C. K.; Martelli, P. B.; Reis, B. F.; Lima, J. L. F. C.; Saraiva, M. L. M. F. S.; *J. Autom. Methods. Manage. Chem.* **2004**, *26*, 1.
16. Pires, C. K.; Reis, B. F.; Galhardo, C. X.; Martelli, P. B.; *Anal. Lett.* **2003**, *36*, 3011.
17. Reis, B. F.; Giné, M. F.; Zagatto, E. A. G.; Lima, J. L. F. C.; Lapa, R. A.; *Anal. Chim. Acta* **1994**, *293*, 129.
18. Martelli, P. B.; Reis, B. F.; Kronka, E. A. M.; Bergamin Filho, H.; Korn, M.; Zagatto, E. A. G.; Lima, J. L. F. C.; Araujo, A. N.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *308*, 397.
19. Sigma Diagnostics;  *$\beta$ -hydroxybutyrate*, cat. 310-A, ST. Louis - USA, 1994.
20. Labtest Diagnóstica; *Glicose PAP Liquiform*, cat. 84-2/250, MG – BR, 2000.
21. Labtest Diagnóstica; *Cholesterol Liquiform*, cat. 76-2/100, MG – BR, 1999.
22. Kiba, N.; Koemado, H.; Furasawa, M.; *Talanta* **1994**, *41*, 1583.
23. Matsumoto, K.; Kamikado, H.; Matsubara, H.; Osajima, Y.; *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 147.
24. Martelli, P. B.; Reis, B. F.; Araujo, A. N.; Montenegro, M. C. B. S. M.; *Talanta* **2001**, *54*, 879.
25. Ricardo, C. P. P.; Teixeira, A. R. N.; *Enzimas*, 4ª ed., Plátano Ed. S. A.: Lisboa, 1993.
26. Suelter, C. H.; *A Practical Guide to Enzymology*, John Wiley & Sons: New York, 1985, p. 27.
27. Harris, D. C.; *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company: New York, 1995, p. 62.
28. Ridder, C.; Hansen, E. H.; Ruzicka, J.; *Anal. Lett.* **1982**, *15*, 1751.