

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

**LEONARDO PEREIRA DE SIQUEIRA**

**Desenvolvimento de um biossensor para determinação  
de triglicerídeos**

**RECIFE-PE**  
**FEVEREIRO, 2009**

# **Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para determinação de triglicerídeos**

Leonardo Pereira de Siqueira

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva

Co-Orientadores: Prof<sup>o</sup> Dra. Maria do Carmo Barros Pimentel

Prof<sup>o</sup> Dra. Neide Kazue Sakugawa Shinohara

**RECIFE-PE**

**2008**

Siqueira, Leonardo Pereira de

**Desenvolvimento de um biossensor para determinação de triglicerídeos /  
Leonardo Pereira de Siqueira. – Recife: O Autor, 2009.**

**68 folhas : il., fig.**

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB.  
Bioquímica, 2009.

**Inclui bibliografia e anexos.**

1. Lipídios 2. Triglicerídeos 3. Lipase 4. Biossensor eletroquímico 5.  
*Screen-printing* I Título.

**577.115 CDU (2.ed.)**

**UFPE**

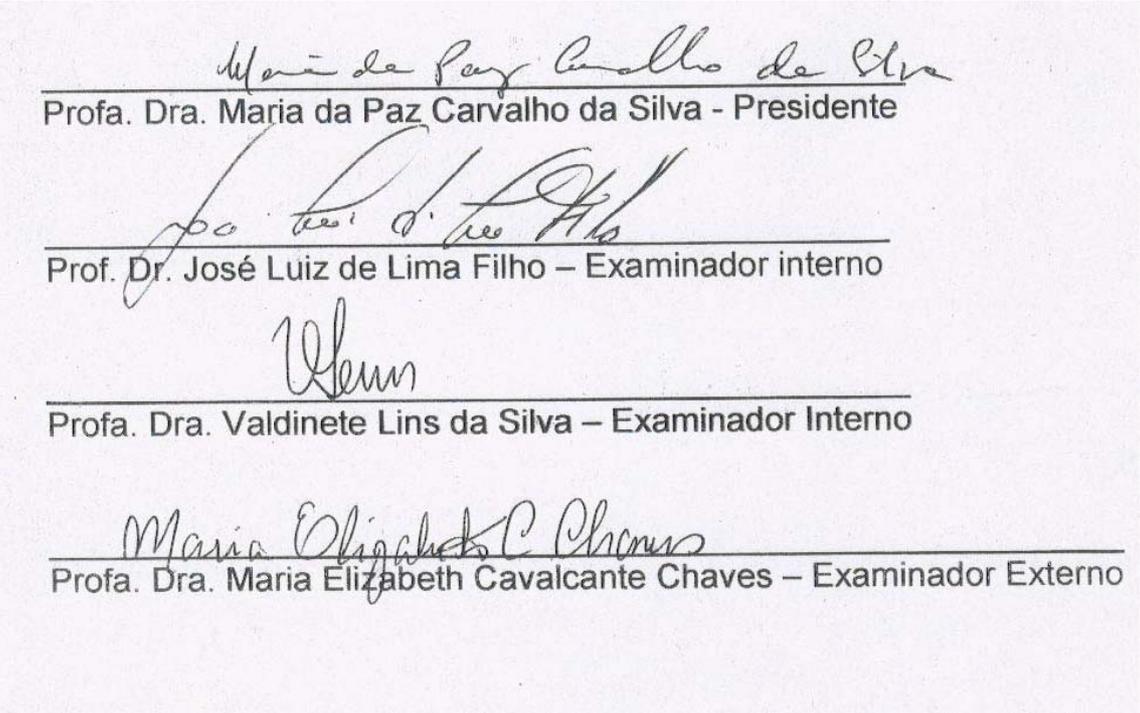
**572.57 CDD (22.ed.)**

**CCB – 2009- 087**

LEONARDO PEREIRA DE SIQUEIRA

**“Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para determinação  
de triglicerídeos”**

Aprovado por:



*Maria da Paz Carvalho da Silva*  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva - Presidente

*José Luiz de Lima Filho*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho – Examinador interno

*Valdinete Lins da Silva*  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Valdinete Lins da Silva – Examinador Interno

*Maria Elizabeth Cavalcante Chaves*  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves – Examinador Externo

---

*Aos meus Pais, Leo Siqueira e Cleoneide Oliveira; aos meus Irmãos, Leo, Salvinho e Rafinha; à minha Namorada, Sandrinha e aos meus familiares e amigos dedico.*

---

## AGRADECIMENTOS

*À Deus, pela minha vida e força de espírito em todos os momentos;*

*Aos meus pais que me apoiaram de modo incondicional, suportando a distância, a saudade e a preocupação;*

*À minha Namorada, Sandrinha, pela sua compreensão e paciência nos momentos que mais precisei;*

*A toda minha Família pelo amor, carinho e força que me deram durante toda minha vida;*

*À Seu Dilsinho e Dona Orleide por terem me acolhido como um filho, sempre me impulsionando para frente;*

*Aos meus Tios, Selma e Vital, por toda dedicação e confiança investidos em mim;*

*À minha orientadora Profa. Maria da Paz e co-orientadoras Profa. Maria do Carmo e Profa. Neide Shinohara que com muita sabedoria, atenção e paciência me ajudaram a desenvolver esse trabalho;*

*Aos meus Amigos, Douglas, Roberto Mota, Pabyton, Roberto Afonso, Gustavo, Nataly, Elaine, Dani Padilha, “Primus”, Edgar, Petrus, Pedro, por terem me mostrado o verdadeiro valor da amizade;*

*As amigas Amanda, Manuela e Neide por todos os conselhos e palavras de carinho que me fizeram ter força para ultrapassar barreiras;*

*A todos os funcionários do LIKA, pela ajuda, força e pelos momentos de descontração, o meu muito obrigado!*

# ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b><u>9</u></b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b><u>10</u></b>
<b>RESUMO.....</b>	<b><u>11</u></b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b><u>12</u></b>
<b><u>1. INTRODUÇÃO .....</u></b>	<b><u>13</u></b>
<u>1.1 Triglicerídeos.....</u>	<u>13</u>
<u>1.2 Lipases.....</u>	<u>16</u>
<u>1.3 Hidrólise Enzimática de Triglicerídeos .....</u>	<u>20</u>
<u>1.4 Métodos de Imobilização de Enzimas .....</u>	<u>22</u>
<u>1.5 Biossensores.....</u>	<u>23</u>
<u>1.6 Eletrodos Fabricados por Screen-printing .....</u>	<u>25</u>
<u>Referências.....</u>	<u>30</u>
<b><u>2. OBJETIVOS .....</u></b>	<b><u>40</u></b>
<u>Geral .....</u>	<u>40</u>
<u>Específicos.....</u>	<u>40</u>
<b>ARTIGO .....</b>	<b><u>41</u></b>
<u>Resumo .....</u>	<u>41</u>
<u>Abstract.....</u>	<u>42</u>
<u>Introdução.....</u>	<u>43</u>
<u>Material e Métodos .....</u>	<u>45</u>
<u>Resultados e Discussão.....</u>	<u>48</u>
<u>Conclusão.....</u>	<u>58</u>
<u>Referências Bibliográfica.....</u>	<u>58</u>
<b><u>4. CONCLUSÕES.....</u></b>	<b><u>61</u></b>
<b>ANEXO.....</b>	<b><u>63</u></b>
<u>Química Nova: Instruções aos Autores.....</u>	<u>64</u>

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

<a href="#"><u>Figura 1. Estrutura básica da molécula de triglicerídeo</u></a> .....	<a href="#"><u>14</u></a>
<a href="#"><u>Figura 2. Estrutura quaternária da lipase de <i>Candida albicans</i></u></a> .....	<a href="#"><u>17</u></a>
<a href="#"><u>Figura 3. Reação de hidrólise do triglicerídeo catalisada pela lipase</u></a> .....	<a href="#"><u>18</u></a>
<a href="#"><u>Figura 4. Reações catalisadas por lipases</u></a> .....	<a href="#"><u>19</u></a>
<a href="#"><u>Figura 5. Métodos de imobilização</u></a> .....	<a href="#"><u>23</u></a>
<b>Figura 6.</b> Esquema didático de um transdutor amperométrico .....	24
<b>Figura 7.</b> Eletrodo impresso (screen-printed electrode) .....	27

### ARTIGO

<a href="#"><u>Figura 1.</u></a> Modelo esquemático do TIP .....	<a href="#"><u>47</u></a>
<a href="#"><u>Figura 2.</u></a> Efeito do pH na atividade da lipase solúvel utilizando o método do pNPM em tampões 50mM fosfato de sódio (pH 7; 7,5) e Tris HCl (pH 7,5; 8,0; 8,5) .....	<a href="#"><u>49</u></a>
<a href="#"><u>Figura 3.</u></a> Efeito da temperatura na atividade da enzima solúvel em Tampão Tris-HCl 50mM, pH 8.....	<a href="#"><u>50</u></a>
<a href="#"><u>Figura 4.</u></a> Efeito da concentração do substrato na atividade da enzima solúvel, utilizando o método do pNPM para medida da atividade, em tampão fosfato 50mM, pH 8, 25°C .....	<a href="#"><u>51</u></a>
<a href="#"><u>Figura 5.</u></a> Gráfico duplo-recíproco da atividade da lipase solúvel em diferentes concentrações de pNPM/Tris-HCl 50mM, pH8 .....	<a href="#"><u>52</u></a>
<a href="#"><u>Figura 6.</u></a> Voltamogramas resultante da adição de diferentes concentrações de trioleína (0,25 – 2,0 mM) frente à um TIP sem lipase imobilizada (TIP branco) .....	<a href="#"><u>53</u></a>
<a href="#"><u>Figura 7.</u></a> Estudo voltamétrico (50mV/s) e potenciais variando de -0,8 e +0,8V do biossensor de triglicerídeo, quando o biossensor foi imerso em soluções de triglicerídeo (0,25 mM – 2,0 mM) .....	<a href="#"><u>54</u></a>
<a href="#"><u>Figura 8.</u></a> Curva padrão concentração de triglicerídeos variando de 0,25 a 2,0 mM em biossensor amperométrico baseada em lipase imobilizada em pasta de carbono e quitosana.....	<a href="#"><u>55</u></a>

**Figura 9.** Estudo voltamétrico da lipase solúvel, com potenciais variando de -0,8 e +0,8V, quando o biossensor foi imerso em soluções de triglicerídeo (0,25 mM – 2,0 mM) ..... [56](#)

**Figura 10.** Curva padrão concentração de triglicerídeos variando de 0,25 a 2,0 mM em biossensor amperométrico com lipase solúvel ..... [57](#)

## LISTA DE TABELAS

<a href="#"><u>Tabela 1.</u></a> Atividades das lipases imobilizada e solúvel em função da concentração de trioleína.....	<a href="#"><u>57</u></a>
---	---------------------------

## RESUMO

A necessidade de métodos mais versáteis para a mensuração e monitoramento dos níveis séricos de lipídios tem estimulado a produção de uma grande variedade de novos métodos analíticos. O presente trabalho mostra o desenvolvimento de um biossensor monoenzimático para detecção de triglicerídeos empregando a tecnologia de “Screen-printing” através da qual, foram impressos os eletrodos de referência (Ag/AgCl) e o de trabalho contendo uma mistura de carbono e quitosana. A lipase foi imobilizada por adsorção no eletrodo de trabalho. A lipase solúvel, usando pNPM, apresentou pH ótimo de 8 e temperatura ótima de 32,5°C, mantendo cerca de 78,5% da atividade máxima a 25°C (temperatura operacional do biossensor). O  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  para a lipase solúvel em relação ao pNPM foram de 0,95 mM e 25,51 U/mg proteína, respectivamente. No biossensor desenvolvido com apenas lipase imobilizada, usando trioleína como substrato, foram de 0,148 mM e 262,21  $\mu A/s$  e 0,304 mM e 85,07  $\mu A/s$  para a lipase solúvel e TIP sem enzima. Os resultados mostraram linearidade nas respostas de correntes para trioleína (0,25mM – 2mM), atestando a viabilidade do biossensor desenvolvido, utilizando unicamente a lipase imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho, podendo ser empregado eficientemente para a detecção de triglicerídeos.

**Palavras-chaves:** Biossensor eletroquímico, Lipase, Triglicerídeo, Screen-printing.

## ABSTRACT

Due to the necessity of more versatile methods for measure and accompany the lipid serum level, the production of several new analytical methods has been stimulated. This work shows a development of a monoenzymatic biosensor for triglycerides detection using Screen-printing technology, in which the reference electrodes (Ag/AgCl) and work electrode containing a mixture of carbon and chitosan 5% (w/w) were printed. The enzyme lipase was immobilized by adsorption on the work electrode. The soluble lipase presented optimum pH of 8.0, temperature of 32.5°C, keeping around 78% of its maximum activity at 25°C (biosensor work temperature).  $K_m$  and  $V_{max}$  for soluble lipase using *p*NPM as substrate were 0.95 mM and 25.51 U/mg protein, respectively. However for the developed biosensor with immobilized lipase only using triolein as substrate  $K_m$  and  $V_{max}$  were 0.148mM and 262.21  $\mu$ A/s, 0.34 mM and 85.07  $\mu$ A/s for soluble lipase and TIP without enzyme, respectively. The results showed linearity when triolein was used as substrate (0,25mM – 2mM) certifying the viability of the biosensor developed, using only immobilized lipase on the surface of work electrode, suggesting that it can be efficiently employed in the triglycerides detection.

**Keywords:** electrochemical biosensors, Lipase, Triglycerides

## **1. INTRODUÇÃO**

O biossensor pode ser definido como um sensor químico que detecta um composto químico ou uma espécie biológica (analito) simplesmente através da reação com um material biologicamente sensível, gerando um sinal analítico (ALFAYA et al. 2002; POHANKA et al., 2008). A crescente necessidade de identificação e quantificação de metabólitos de forma rápida, específica e em quantidades de amostras muito pequenas (líquidos corpóreos) no campo da medicina, impulsionou o desenvolvimento dos biossensores nos últimos anos.

Biossensores representam uma ferramenta promissora para suplementar às técnicas existentes para determinação de triglicerídeos devido as suas características únicas, tais como: seletividade, relativo baixo custo de construção, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para monitoramento (ROSATTO et al., 2001; RICCARDI et al., 2002; MARQUES et al., 2008). Portanto, seguindo esse mesmo objetivo pode-se pensar na construção de biossensores para mensuração da concentração de triglicerídeos.

### ***1.1 TRIGLICERÍDEOS***

Os Triglicerídeos (TGs) são os lipídeos mais simples e abundantes que contêm os ácidos graxos como unidades fundamentais, também conhecidos como gorduras ou gorduras neutras. Os TGs são ésteres do glicerol com três moléculas de ácidos graxos, e são componentes principais de armazenamento ou depósito de gorduras nas células das plantas e animais, mas não são normalmente encontrados em membranas. Outra característica importante é que suas moléculas são hidrofóbicas, não-polares, pois não

contêm grupos funcionais eletricamente carregados ou altamente polares (LEHNINGER et al., 2007).

Os TGs são formados basicamente por uma molécula de glicerol, que está ligado a três radicais de ácidos graxos (Figura 1). O glicerol é um composto com três átomos de carbono (C), cada um dos quais contendo uma cadeia lateral álcool. O C<sup>2</sup> é um átomo de carbono proquiral, e pode tornar-se assimétrico quando diferentes grupamentos estão ligados às hidroxilas de C<sup>1</sup> e C<sup>3</sup>; naturalmente ocorrem derivados do glicerol que correspondem ao L-gliceraldeído. A ligação de um ácido graxo a um álcool produz ésteres e estas são ligações de baixa energia. Os três ácidos graxos que ocorrem em cada TG são em geral diferentes. Além disso, as acilas em C<sup>2</sup> são em geral insaturadas. A manteiga e a margarina consistem, predominantemente de triglicerídeos (FERRER et al., 2000).

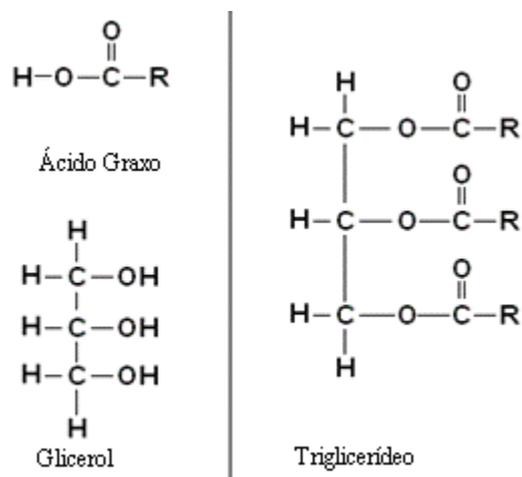


Figura1. Estrutura básica da molécula de triglicerídeo

Os TGs existem em muitos tipos diferentes, dependendo da identidade e posição dos três ácidos graxos esterificados ao glicerol. Aqueles que contêm um único tipo de ácido graxo, em todas as posições, são chamados de triglicerídeos simples, e são denominados de acordo com o ácido graxo que contenham. Os exemplos são o

triestearoilglicerol, o tripalmitoilglicerol e o trioleilglicerol, que contêm respectivamente o ácido esteárico, o ácido palmítico e o ácido oléico. Os nomes mais triviais e mais comumente usados destes triglicerídeos simples são respectivamente triestearina, tripalmitina e trioleína. Os TGs que contêm dois ou mais ácidos graxos diferentes são chamados de triglicerídeos mistos. A maioria são gorduras naturais, como as do óleo de oliva, da manteiga e outras gorduras alimentares, são misturas complexas de TGs simples e mistos, contendo uma variedade de ácidos graxos que diferem na extensão da cadeia e no grau de saturação (LEHNINGER et al., 2007).

As propriedades dos ácidos graxos e dos lipídeos deles derivados são muito dependentes de seu comprimento de cadeia e de seu grau de saturação. Os ácidos graxos insaturados têm o ponto de fusão menor do que os saturados do mesmo comprimento. Por exemplo, o ponto de fusão do ácido esteárico é de 69,6°C, enquanto o do oléico (que contêm uma dupla ligação cis) é de 13,4°C. Os pontos de fusão dos ácidos graxos poliinsaturados da série em C<sup>18</sup> são ainda mais baixos. O comprimento de cadeia também afeta o ponto de fusão, como é observado quando comparamos as temperaturas de fusão do ácido palmítico (C<sup>16</sup>), que é de 6,5°C, abaixo da temperatura de fusão do ácido esteárico (C<sup>18</sup>). Desse modo, o comprimento pequeno da cadeia e a insaturação aumentam a fluidez dos ácidos graxos e de seus derivados (STRYER et al., 2008).

Os TGs contendo apenas ácidos graxos saturados, como a triestearina, o principal componente da gordura bovina, são sólidos gordurosos brancos à temperatura ambiente. Os TGs que contêm três ácidos graxos insaturados, como a trioleína, o principal componente do óleo de oliva, são líquidos. A manteiga é uma mistura de triacilgliceróis, alguns dos quais possuem ácidos graxos de cadeia relativamente curta. Como os ácidos graxos de cadeia curta possuem pontos de fusão baixos, eles conferem à manteiga sua maciez à temperatura ambiente (LEHNINGER et al., 2007).

Os TGs naturais são insolúveis em água, possuem uma densidade específica menor do que a da água, o que explica o fato do óleo formar a camada superior dos molhos de salada, óleo-vinagre. Os TGs facilmente se dissolvem em solventes não polares, como o clorofórmio, benzeno ou éter, que frequentemente são usados para extrair as gorduras dos tecidos. Sofrem hidrólise quando aquecidos com ácidos ou bases ou quando atacados enzimaticamente pela lipase, secretada no intestino delgado pelo pâncreas (LEHNINGER et al., 2007).

Os TGs são reservas altamente concentradas de energia metabólica porque são reduzidos e anidros. Nos mamíferos, o principal local de acúmulo de TGs é o citoplasma de células adiposas (células gordurosas). O evento inicial na utilização de gordura como fonte de energia é a hidrólise de TGs por lipases (STRYER et al. 2008).

## ***1.2 LIPASES***

As lipases (Figura 2) são biocatalisadores extremamente versáteis e muito eficientes (YIN et al.,2006), que, ao lado de esterases e proteases, têm uma posição de destaque nestes meios reacionais, devido à gama de reações catalisadas por estas enzimas em sistemas orgânicos com baixo teor de água (esterificação, interesterificação, aminólise, lactonização), à estabilidade apreciável nestes ambientes e à possibilidade de utilização de condições reacionais brandas (BOUAID et al., 2007).

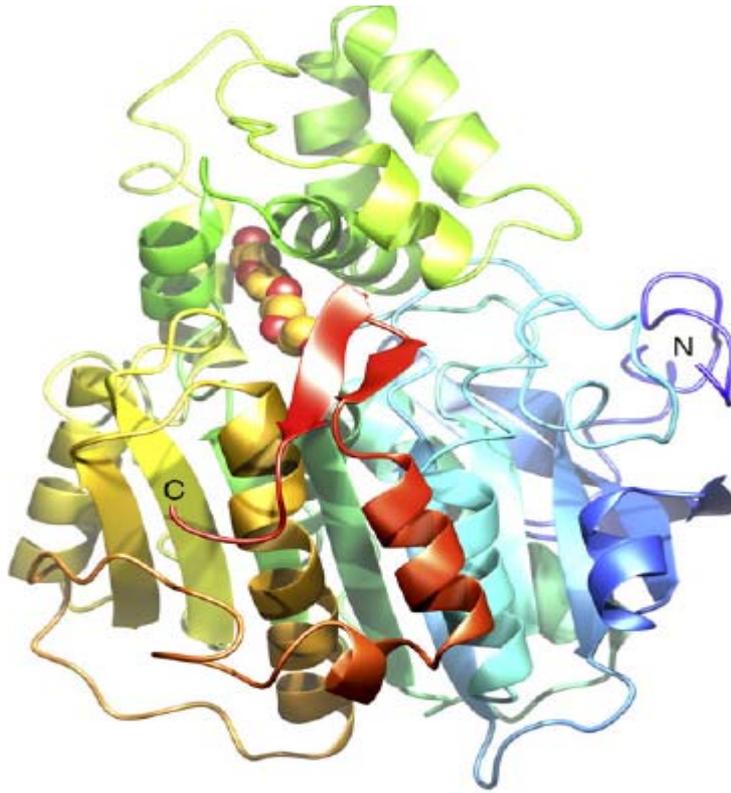


Figura 2. Estrutura quaternária da lipase de *Candida albicans*.  
(ERICSSON et al, 2008)

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações ésteres presentes em acilgliceróis (Figura 3), liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases (DALLA-VECHIA et al, 2004). Em geral, as lipases exercem as suas ações biocatalíticas na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, a nível da interface lipídeo/água (PINHEIRO et al, 2007; PIMENTEL et al., 2007). O sítio catalítico é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, que se repete em todas as estruturas e é freqüentemente protegido na molécula por uma “tampa” hidrofóbica ou “lid” que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases. Estudos de raio-X realizados por Ericsson e colaboradores, com a lipase da

*Candida Antarctica*, revelaram a existência de uma “tampa” similar recobrando a tríade catalítica Ser-His-Asp (ERICSSON et al., 2008).

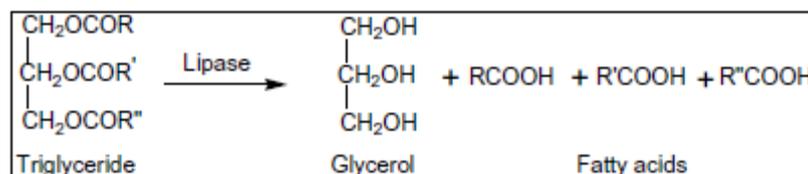


Figura 3: Reação de hidrólise do triglicerídeo catalisada pela lipase.

A diferenciação entre uma lipase e uma esterase (E.C. 3.1.1.1) está no fato de que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterase atua em substratos solúveis (ALVAREZ-MACARIE et al., 1999). Em 1958, Sarda *et al.* propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética, que é a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. As lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água (SARDA et al., 1958; COSTA et al.; 1999).

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais, plantas e microrganismos, dentre as quais as mais utilizadas são de *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas glumae*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Chromobacterium viscosum*, lipases pancreática de cavalo, lipase pancreática humana e lipase pancreática, as quais têm suas estruturas determinadas. A massa molecular destas enzimas varia de 20-75 kDa. Seu ponto isoelétrico varia em uma faixa de 3,6 e 7,6, sendo majoritariamente acídicas, com pI entre 4 e 5 (FERRER et al., 2000; MAYORDOMO et al., 2000).

Nas últimas décadas tem sido feito muito uso dessa classe de enzima na fabricação de produtos comerciais que vão desde produtos alimentares e detergentes têxtil a drogas farmacêuticas (PIMENTEL et al, 2007). As lipases são capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação, transesterificação e lactonização (Figura 4). Esta flexibilidade aliada a diferentes possibilidades de especificidade de substrato existentes entre as diferentes lipases e confere a estas enzimas um potencial enorme de aplicações em diversas áreas (GHANDI et al., 1997).

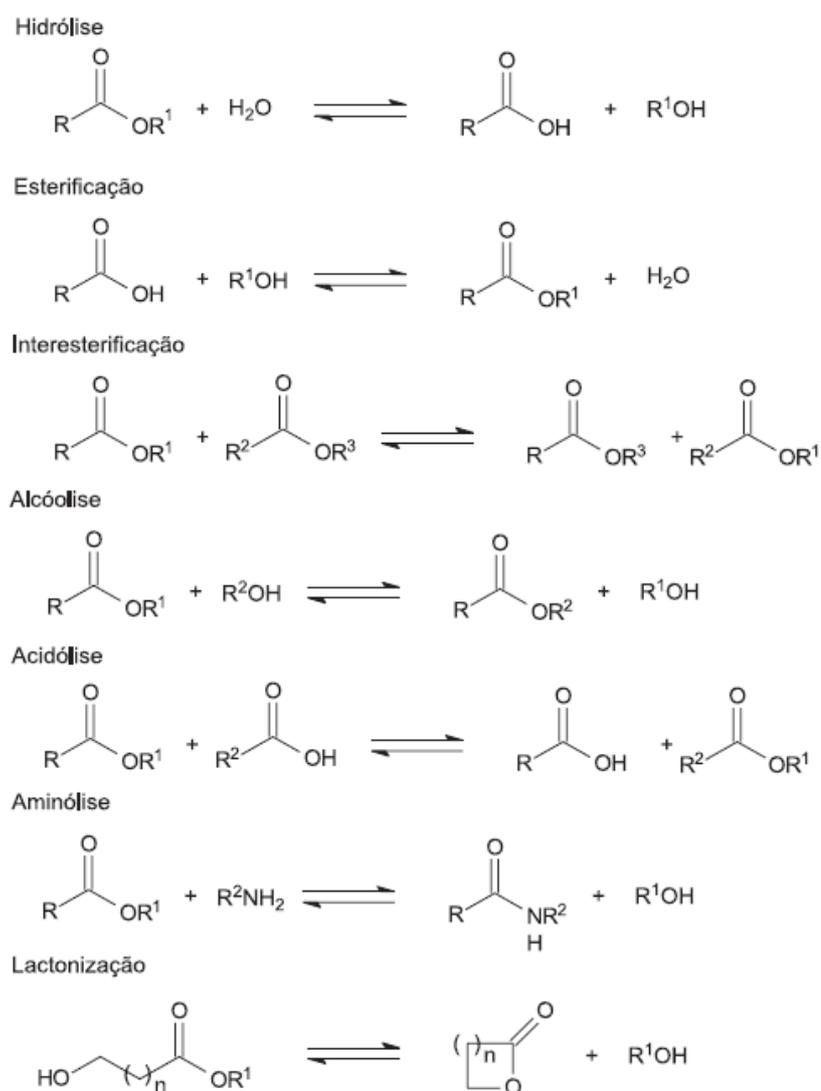


Figura 4. Reações Catalisadas por Lipases  
 Fonte: PAQUES et al., 2006

Entre os processos químicos de maior interesse industrial estão as reações catalisadas pelas lipases, as quais representam aproximadamente 20% das biotransformações realizadas atualmente (FABER, 2000). As razões desse enorme potencial biotecnológico das lipases incluem fatos relacionados com: I) sua alta estabilidade em solventes orgânicos; II) não requerem a presença de cofatores; III) possuem uma larga especificidade pelo substrato e IV) exibem uma alta enantiosseletividade (GANDHI, 1997).

### ***1.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE TRIGLICERÍDEOS***

O processo de hidrólise enzimática precisa de dois requisitos: a formação de uma interface lipídeo/água e a absorção da enzima nesta interface (PIMENTEL et al., 2007). Assim, quanto maior a interface, maior a quantidade de enzima adsorvida, acarretando taxas de hidrólise mais elevadas (BALCÃO et al., 1996). Diferentes parâmetros podem influenciar o desempenho da hidrólise de óleos e gorduras e, conseqüentemente, diversas técnicas têm sido utilizadas para aumentar a taxa de hidrólise de gorduras usando lipases como catalizadores (OLIVEIRA et al., 1999).

A hidrólise do óleo de palma foi investigada para obtenção de mono e diacilgliceróis empregando preparações de lipases de fontes microbianas (*Candida rugosa*), vegetal (gérmen de trigo) e animal (pâncreas de porco). Entre as lipases testadas, as taxas de conversão de hidrólise mais elevada foram obtidas com a lipase de *Candida rugosa*, apresentando atividade ótima a 37°C e pH=7,5 (KHOR, et al. 1986).

Estudos com a hidrólise de sebo e óleos de coco e oliva, utilizando lipase de *Candida rugosa*, *Aspergillus Níger* e *Rizhopus arrhius*, foram realizados onde a reação

em emulsão foi conduzida em sistemas de frascos agitados, obtendo-se altos valores de conversão (97-99% em 72h) segundo Linfield et al., 1984.

Park et. al., (1998) estudaram a hidrólise de óleo de soja com diferentes tipos de lipases tendo como principal objetivo a comparação das atividades dessas enzimas em sistemas isolados e combinados. Após 10h de reação, verificou-se que os sistemas combinados de lipases microbianas, tais como *Penicillium sp.* e *Rhizopus niveous*, forneceram rendimentos mais elevados com 98,0 e 99,5% de hidrólise, que os obtidos em sistemas contendo apenas uma lipase (7,2 e 44,4% de hidrólise).

O uso de solventes no meio reacional também tem sido responsável pelo aumento das taxas de hidrólise dos triacilgliceróis. Diferentes solventes foram testados no processo de hidrólise de óleos em sistema com emulsão, e o isoctano foi considerado o mais adequado (MUKATAKA, et al, 1985). A hidrólise do óleo de oliva catalisada pela lipase de *Candida rugosa*, em um sistema emulsificado apenas por agitação mecânica, apresenta taxas de hidrólise similares às obtidas nos sistemas reacionais contendo emulsificante (WANG, 1988).

A hidrólise enzimática em ácidos graxos, a partir de óleos comerciais de alta acidez como o de coco, soja, mostarda, girassol e arroz, foi investigada por Ghosh e Bhattacharyya (1995). Acilgliceróis neutros de óleos de alta acidez foram hidrolisados por lipase de *Candida rugosa* quase completamente, num período máximo de 48h. O óleo de coco, com acidez inicial de 69,2% em ácido láurico, foi hidrolisado numa temperatura de 35°C durante 48h, atingindo acidez final de 80%.

Oliveira et al. 1999, analisaram a influência da concentração de lipase e do tempo de reação no desempenho da hidrólise da gordura de babaçu por lipase comercial, empregando a metodologia de superfície de resposta, sendo obtidas taxas de conversão entre 6,52% e 41,44%. O ponto ótimo do processo (maior porcentagem de hidrólise no

menor tempo possível), entretanto, não foi alcançado, tendo em vista que o planejamento fatorial proposto não cobriu a faixa correspondente a maiores tempo de reação.

#### ***1.4 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA***

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos (SOARES et al., 1999). Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (SOARES et al., 1999).

Na literatura, vários métodos têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações (VILLENEUVE et al., 2000; PAIVA et al., 2000, DALLA-VECCHIA et al, 2004; BRUNO et al., 2004, PIMENTEL et al., 2007). Em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas puras pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Além disso, a recuperação do meio reacional pode ser difícil (FABER, 2000).

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (REJASSE et al., 2003). A Figura 5 mostra,

esquemáticamente, a classificação dos principais métodos utilizados para imobilização de enzimas

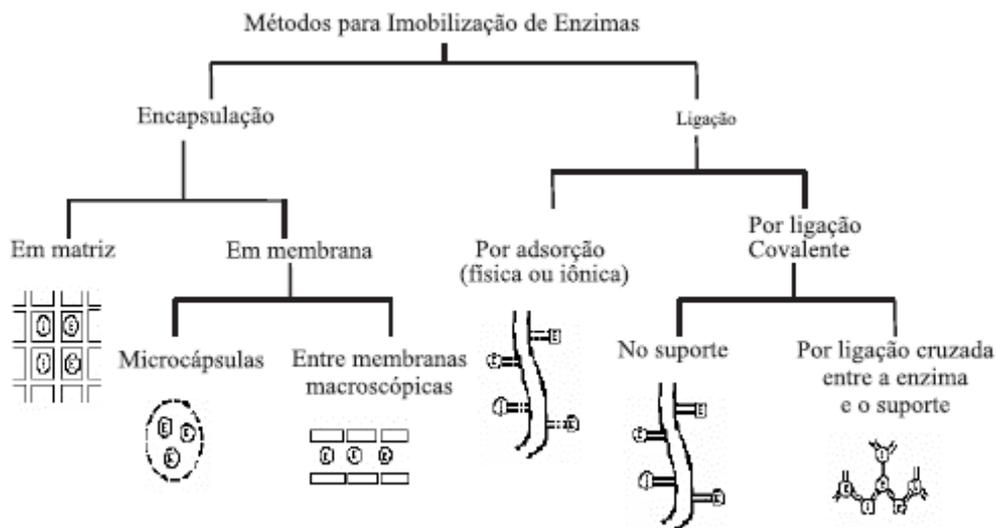


Figura 5. Métodos de imobilização de enzimas  
Fonte: DALLA-VECCHIA et al., 2004

### 1.5 BIOSSENSORES

Muitos procedimentos analíticos, para sua execução, precisam de uma instrumentação complexa e pessoal capacitado. Os sensores químicos são dispositivos pequenos, robustos, portáteis, de fácil manipulação e não há necessidade de adição contínua de reagentes para o seu funcionamento, podendo, com essas características, fornecer informações precisas e confiáveis continuamente (ALFAYA et al, 2002).

De acordo com a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) um biossensor eletroquímico pode ser definido como um dispositivo independente que é capaz de fornecer uma informação analítica específica quantitativa ou semi-quantitativa utilizando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico), que é mantida em contato direto com um elemento de transdução eletroquímica.

Quando este elemento biológico é uma enzima, estes sensores são denominados biossensores enzimáticos que, entre outros, podem fazer uso da atividade enzimática como sinal analítico a ser monitorado. O principal objetivo de um biossensor é produzir um sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ou frequência à concentração de um determinado analito ou grupo de analitos que interagem com um elemento biossensível (MARQUES et al., 2008).

Segundo Riccardi et al. (2002), de acordo com o transdutor utilizado, o biossensor pode ser classificado como eletroquímico (potenciométrico, amperométrico e condutimétrico), óptico (medida de luminescência, fluorescência, elipsimetria, etc.), detector de massa (relaciona a oscilação da frequência dos cristais piezelétricos com variação da massa).

O transdutor amperométrico (Figura 6) emprega a medida de intensidade de fluxo corrente de uma célula eletroquímica a um potencial baixo e fixo em relação a um eletrodo de referência, sendo a corrente gerada por reação redox na superfície sensítiva, proporcional a concentração do analito (LIU et al., 2005).

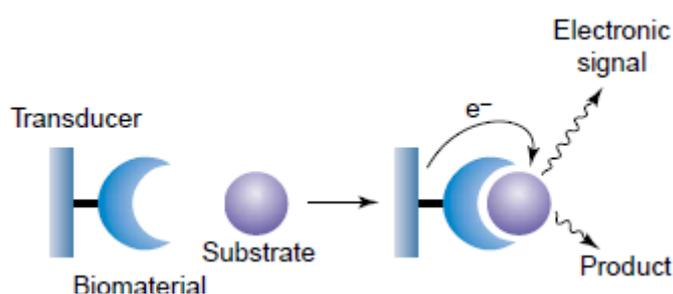


Figura 6. Esquema didático de um transdutor amperométrico.  
Fonte: WILLNER & WILLNER *et al.*, 2001

A grande aplicabilidade dos biossensores está relacionada às suas vantagens, podendo-se destacar: sensibilidade, seletividade, especificidade, respostas rápidas, potencial para miniaturização, número variável de enzimas disponíveis comercialmente,

além de uma grande variedade de metodologias empregadas na construção destes sensores biológicos (MARQUES et al., 2008).

Os primeiros biossensores amperométricos foram descritos pelos eletrodos desenvolvidos e descritos por Clark & Lyons (1962), numa aplicação para determinação de glicose. Estes são conhecidos como eletrodos de enzima, nos quais acoplaram a enzima glicose oxidase a um eletrodo amperométrico e a concentração de glicose foi medida através do consumo de O<sub>2</sub> (CROUCH et al., 2005).

Atualmente os biossensores apresentam aplicações nas mais diversas áreas: diagnóstico clínico, monitoramento intensivo da saúde, monitoramento em tempo real, indústria de alimentos, controle do meio ambiente controle de infecções hospitalares, na biodefesa, entre outras (SILVA et al., 2007).

### ***1.6. ELETRODOS FABRICADOS POR SCREEN-PRINTING***

A técnica de screen-printing é um processo mecânico de fabricação de filmes condutores, largamente utilizados no mercado, onde tintas condutoras são passadas através das aberturas de uma tela e depositada sobre um substrato (WILL et al., 2000). Esta técnica foi inicialmente desenvolvida para atender as necessidades da indústria de circuitos eletrônicos, mas mostrou-se bastante interessante para a fabricação de eletrodos para pilhas combustíveis e biossensores (DEBEDA-HICKEL et al., 2005), produzindo filmes homogêneos com espessuras que podem chegar a menos de 10 µm, dependendo da abertura da tela utilizada (DOLLEN et al., 2005).

As primeiras propostas científicas com sucesso para o desenvolvimento de biossensores eram baseadas em sensores eletroquímicos para diversos metabólitos clínicos, tais como para detecção da glicose (KAFI et al. 2006), da creatinina

(RADOMSKA et al., 2004), do lactato (D'AURIA et al, 2000), da uréia (BARHOUMI et al, 2005), fosfatase alcalina (RAO et al., 2006) e do colesterol sérico (SINGH et al., 2007). Os biossensores eletroquímicos já vêm sendo estudados por algum tempo mostrando ser uma ferramenta viável para a detecção de analitos de interesse clínico, monitoramento ambiental e controle de processos (WANG, 1998). Atualmente, os transdutores baseados em semicondutores e os eletrodos screen-printed representam uma plataforma típica para a construção dos biossensores (POHANKA & SKLÁDAL, 2008)

A construção de eletrodos com a tecnologia screen-printing surgiu com a expectativa de suprimir a procura por eletrodos com praticidade operacional; proporcionando assim a oportunidade de realizar uma grande gama de análises clínicas, ambientais e industriais, sem a necessidade de estar em um laboratório para execução dessas mesmas análises (BRUNETTI et al, 2000; HART et al. 1997). Essa técnica mostrou ser um procedimento simples e de baixo custo, onde uma tinta condutora é revestida sobre um suporte inerte, podendo este ser de PVC ou material cerâmico. Esses eletrodos são potencialmente portáteis, de fácil operacionalidade e de fabricação simples, aliados ao baixo custo, juntamente com a sua versatilidade e aplicabilidade permitem, a produção de dispositivos descartáveis, conforme a Figura 7 (STRADIOTTO et al. 2003).

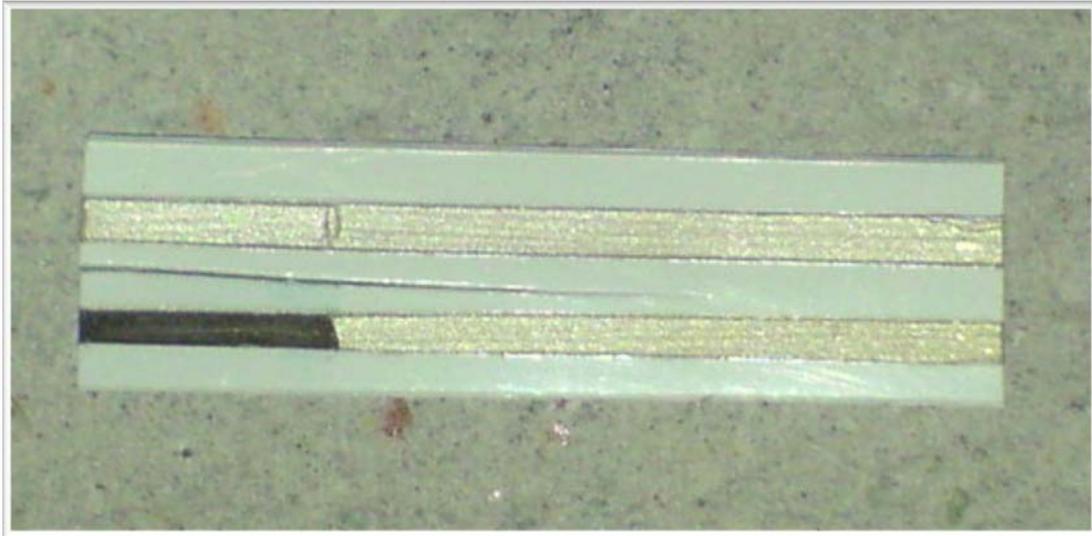


Figura 7. Eletro Impresso (screen-printed electrode).

Na confecção dos eletrodos impressos (EI) são utilizadas uma variedade de tintas condutoras, sendo as tintas de carbono e de metais pesados as que apresentaram melhores resultados com essa finalidade. Levando em consideração que o carbono é barato e apresenta boa condutividade, é o mais utilizado para o desenvolvimento de eletrodos (HART et al., 1997). Essas tintas condutoras, largamente empregadas na confecção dos eletrodos screen-printed, são facilmente encontradas no mercado. Na literatura, podemos encontrar inúmeros trabalhos descrevendo a aplicação dessas tintas e em métodos automatizados aliados a uma grande aplicabilidade com características atóxicas, pois, muitas delas empregam solventes seguros (RAO et al., 2006; CARPINI et al., 2004, RICCI et al. 2002).

Os sensores amperométricos baseados na técnica de screen-printing têm mostrado serem promissores e bem sucedidos nas aplicações para a determinação de biomoléculas, drogas, microrganismos e toxinas ambientais (PODESTÁ et al, 2004). Como exemplo de aplicação em amostras biológicas temos o trabalho de Della Seta et al. (2004) onde testaram diferentes membranas permeáveis (celulose e araldite<sup>®</sup>) ao

oxigênio, em eletrodos fabricados pela técnica de screen-printed, para detecção de glicose obtendo boa performance em termo de sensibilidade, estabilidade e correlação linear entre a corrente produzida e a concentração de glicose testada, quando comparados à um eletrodo impresso de carbono sem o emprego da membrana.

Em outro trabalho, Minakshi (2008) desenvolveu um biossensor para determinação de triglicerídeos imobilizando lipase, glicerol-kinase e glicerol-3-fosfato oxidase no eletrodo de trabalho (platina), usando um eletrodo de Ag/AgCl como referência e um eletrodo de Ag como auxiliar. O eletrodo mensurava os eletros gerados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no potencial de 0,4V formado na reação da trioleína com as enzimas co-imobilizadas no biossensor. Uma relação linear entre a quantidade de trioleína e a corrente formada foi obtida nas concentrações de 0,2-3,5mM. Nesse trabalho foi encontrado um coeficiente de correlação de  $r=0,91$  entre os valores de triglicerídeos séricos obtidos com o biossensor, quando comparados com os kits enzimáticos colorimétricos comerciais.

Em pesquisa desenvolvida por Hsu et al. (2006), onde desenvolveram um eletrodo screen-printed para uso em *Flow Injection Analysis* (FIA), com o objetivo de medir a glicose em plasma humano. Foi utilizado um eletrodo de cobre como sendo o eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência (Ag/AgCl), e um eletrodo auxiliar de platina. Foram coletadas 2 mL de sangue total de 15 voluntários. Posteriormente, essas amostras foram diluídas 200 vezes em NaOH 0,1M, antes de serem injetadas no sistema proposto. O método foi validado comparando com um instrumento já acreditado para análise de glicose, descrito como YSI<sup>®</sup>. Os resultados encontrados se mostraram satisfatórios, podendo ser aplicado na clínica e em amostras ambientais.

Em 2004, Podestá e colaboradores empregaram a técnica de screen-printing na confecção de EI para detecção de pesticidas organofosforados. Nessa pesquisa foi

utilizado um eletrodo de trabalho de pasta de carbono e tinta de prata cloreto de prata para o eletrodo de referência. Os eletrodos foram fabricados para serem utilizados tanto em análises por batelada como em FIA. Os resultados obtidos mostraram uma alta sensibilidade, com a menor detecção limite na concentração com cerca de 5ppb de organofosforados, valor esse que está dentro de uma faixa de segurança toxicológica, uma vez que a convenção internacional que avalia a concentração de resíduos de pesticidas em alimentos, determina que o limite máximo permitido é de 50 ppb (CODEX ALIMENTARIUS, 2000).

Sharma et al., (2006) desenvolveram um imunossensor amperométrico para detecção de *vibrio cholerae*, importante patógeno para saúde pública, em amostras de água doce e salgada, com concentrações (UFC/mL) padrão dessa bactéria, utilizando um dispositivo eletrodo screen-printed. Esse eletrodo empregou tinta carbono, caracterização eletroquímica dos eletrodos, otimização das diluições do anticorpo. A metodologia empregada nas condições desse experimento mostrou-se simples e viável para o monitoramento do *vibrio cholerae*, levando em média cerca 50 minutos para obtenção dos seus resultados, enquanto que a metodologia convencional leva em média 5 dias para confirmação da presença desse patógeno em amostras de água.

Shyuan et al. (2006) construíram um biossensor para detecção de ácido 2,4-diclorofenolacético (2,4-D), um pesticida organofosforado, baseado em eletrodo de carbono screen-printed. No eletrodo de trabalho foi depositado um filme de quitosana e imobilizada a enzima fosfatase alcalina. O 2,4-D foi determinado pela quantificação da inibição da fosfatase alcalina. Ácido ascórbico 2-fosfato (AA2P) foi utilizado como substrato para indicar a inibição do 2,4-D. A reação enzimática foi monitorada amperometricamente com potencial de +600 V e pH ótimo 8,5. Houve resposta linear para o intervalo de 10-80 $\mu$ M para o substrato AA2P.

Laschi et al. (2005) trabalharam no desenvolvimento de um sensor usando a tecnologia screen-printed para análise de chumbo em amostras ambientais. Os eletrodos foram confeccionados usando uma máquina para screen-printing conhecida como DEK 248 screen-printing machine (DEK, Weymouth, UK). O sensor consistiu de três eletrodos: um eletrodo de trabalho de ouro; um eletrodo de referência de prata e um eletrodo auxiliar de grafite. Os parâmetros analisados permitiram a detecção de 0,5µg/L de chumbo por litro de água, em um espaço de tempo de 120s, mostrando ser uma ferramenta promissora para pesquisa desse metal pesado no monitoramento de efluentes ambientais por ser uma alternativa viável de uso quando comparado aos eletrodos de mercúrio e cádmio.

Portanto, diante do exposto pode-se observar que os eletrodos screen-printed são amplamente aceitos na eletroquímica como sensores descartáveis empregados largamente no monitoramento clínica para diversas biomoléculas, monitoramento ambiental (pesticidas e metais pesados) proporcionando uma rápida e simples determinação analítica, aliadas ao baixo custo e à facilidade de fabricação.

### ***REFERÊNCIAS***

ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de material sol-gel na construção de biossensores. *Química Nova*, v. 25, n.5, p. 835-841, 2002.

ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V.; BARATTI, J. Characterization of a Thermostable Esterase Activity from the Moderate Thermophile *Bacillus licheniformis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* v. 63, p. 1865-1870, 1999.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X.: Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme Microb. Technol.* v. 18, p. 392-416, 1996.

BARHOUMI, H.; MAAREF, A.; RAMMAH, M.; MARTELET, C.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; MOUSTY, C.; COSNIER, S.; PEREZ, E.; RICO-LATTES, E. Insulator semiconductor structures coated with biodegradable latexes as encapsulation matrix for urease. *Biosens. Bioelectron.*, v.20, n.11, p.2318–2323, 2005.

BOUAID, A.; APARICIO, J.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J.: Synthesis of a Green biosolvent isopropyl esters: A statistical approach. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 41, p. 533-538, 2007.

BRUNETTI, B.; UGO, P.; MORETTO, L.M.; MARTIN, C.R. Electrochemistry of phenothiazine and methylviologen biosensor electron-transfer mediators at nanoelectrode ensembles. *J. Electroanal. Chem.* v. 491, p. 166-174, 2000.

BRUNO, L. M.; PINTO, G. A. S.; CASTRO, H. F.; LIMA-FILHO, J. L.; MELO, E. H. M. Variables that affect immobilization of *Mucor miehei* lipase on nylon membrane. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 20, p. 371-375, 2004.

CARPINI, G.; LUCARELLI, F.; MARRAZZA, G.; MASCINI, M. Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids. *Biosensors and Bioelectronics*, v.20, n. 2, p.167-175, 2004.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Pesticides residue in food: methods of analysis i sampling. Itália: FAO. 2º edição, 2000.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipase como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova*, v. 22(6), p.863-873, 1999.

CROUCH, E.; COWELL, D. C.; HOSKINS, S.; PITTSOON, R. W.; HART, J. P. A novel, disposable, screen-printed, amperometric biosensor for glucose in serum fabricated using a water-based carbon ink. *Biosensor and Bioelectronic*, v. 21, n. 5, p. 712-718, 2005.

D'AURIA, S.; GRYCZYNSKI, Z.; GRYCZYNSKI, I.; ROSSI, M.; LAKOWICZ, J. R. A protein biosensor for lactate. *Anal. Biochem*, v.283, p.83–88, 2000.

DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DEBEDA-HICKEL, H., LUCAT, C., MENIL, F., “Influence of the Densification Parameters on screen-printed Component Properties”, *Journal of the European Ceramic Society*, v. 25, n. 12, pp. 2115-2119, 2005.

DELLA SETA, C. L.; MARINO, S. MASCI, A. PILOTON, R. Screen printed biosensors based oxygens sensing: use of perm selective membranes. *Sensors and Microsystems. Proceedings of the 8th Italian Conference*. World Sientfic, p. 70-75, 2004.

DOLLEN, P.V., BARNETT, S. A Study of Screen Printed Ytria-Stabilized Zirconia Layers for Solid Oxide Fuel Cells. Journal of the American Ceramic Society, v. 88, n. 12, pp. 3361-3368, Dez. 2005.

ERICSSON, J. D.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANDSTROM; BACKVALL, J.; MOWBRAY, S. X-ray Structure of Candida antarctica Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. J. Mol. Biol. v.376, p. 109-119, 2008.

FABER, K.: Biotransformations in Organic Chemistry, 4th ed., Springer –Verlag: New York, 2000.

FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A. J. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. Chem. Technol. Biotechnol. 2000, 75, 569.

GHANDI, N. N.: Applications of lipases. Journal of the American Oil Chemists Society, v.74, n.6, p. 621-634, 1997.

GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, E. D.: Utilization of acid oils in making valuable fatty products by microbiallipase technology. Journal of the American Oil Chemists' Society, v.72, n.12, p.1541-1544. 1995.

HART, J. P. Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses Trends Anal. Chem. v. 16, n. 2, p. 89-103, 1997.

HSU, C.; CHUNG, H.; LYUU, H.; TSAI, D.; KUMAR, A. S.; ZEN, D. An electrochemical cell coupled with disposable screen-printed electrodes for use in flow injection analysis. Analytical Sciences, v. 22, p.35-38, 2006.

KAFI, A. K.; LEE, D. Y.; PARK, S. H.; KWON, Y. S. DNA as a support for glucose oxidase immobilization at Prussian blue-modified glassy carbon electrode in biosensor preparation. J. Nanosci. Nanotechnol, v.6, n.11, p.3539–3542, 2006.

KHOR, H. T.; TAN, H. N.; CHUA, T. L: Lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil. Journal of the American Oil Chemists Society, v. 63, p. 538-540, 1986.

LASCHI, S.; PALCHETTI, I.; MASCINI, M. Gold-based screen-printed sensor for detection of trace lead. Sensors and Actuators. v. 114, p. 460-465, 2006.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 4 ed. São Paulo: Savier, 2007.

LINFIELD, W. M.; O'BRIEND, D. J.; SEROTA, S: Lipid-lipase Interactions. I. Fat splitting eith lipase from. Journal of the American Oil Chemists' Society. v.61, p.1067-1071. 1984.

LIU, X.; SUN, Y.; SONG, D.; ZHANG, H. Enhanced optical immuosensor based on surface plasmon resonance for determination of transferrin. *Talanta*, v. 68, n. 3, p. 1026-1031, 2006.

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

MAYORDOMO, I.; RANDEZ, G. F.; PRIETO, J. A.; *J. Agric and Food Chem.* v. 48, p. 105, 2000.

MINAKSHI, P. S. P. Construction of an amperometric enzymic sensor for triglyceride determination. *Sensors and Actuators*, v. 133, P. 251-255, 2008.

MUKATAKA, S.; TSTSUO, K. E; JOJI, T: Kinetics of nzymatic hydrolysis of lipids in biphasic organic-aqueous systems. *J. Ferment Technol.* v. 63, n. 5, p. 461-466, 1985.

OLIVEIRA, A. L. A.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N: Partial enzymatic hydrolysis of babassu fat. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* V.2, p. 19. 1999.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases *Enzyme Microb. Technol.* v.27, p. 187, 2000.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Química Nova.* V. 29, p. 93-99, 2006.

PARK, Y. K.; PASTORE, G. M.; ALMEIDA, M. M.: Hydrolysis of soybean oil by a combined lipase system. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. v. 65, p. 119-131, 1998.

PIMENTEL, M. C. B.; LEÃO, A. B. F.; MELO, E. H. M.; LEDINGHAM; LIMA-FILHO, J. L. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on Magnetized Dacron: Kinetic Study. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, v. 35, p. 1–15, 2007.

PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M.; FREIRE, D. M. M. Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v.28, p.444-450, 2008.

PODESTÁ, E.; BOTRÉ, C.; PILOTON, R.; BOTRÉ, F. MAZZEI, F. A screen-printed enzymatic electrode for the determination of organo-phosphorous pesticides. *Sensors and Microsystems. Proceedings of the 8th Italian Conference*. World Scientific, 2004. 592p.

POHANKA, M.; SKLÁDAL, P. Electrochemical biosensors: principles and applications. *J. Appl. Biomed.* v.6, p.57-64, 2008.

RADOMSKA, A.; BODENSZAK, E.; SATANIS, G.; KONCKI, R. Creatinine biosensor based on ammonium ion selective electrode and its application in flow-injection analysis. *Talanta*, v.64, n.3, p.603-608, 2004.

RAO, V. K.; SHARMA, M. K.; PANDEY, P. SEKHAR, K. Comparasion of different carbon ink basead screen-printed electrode towards amperometric immunosensing. World Journal of Microbiology and Biotechnology. V. 22, n. 11, p. 1135-1143, 2006.

REJASSE, B.; MAUGARD, T.; LEGOY, D. M. Enzymatic procedures for the synthesis of water-soluble retinol derivatives in organic media Enzyme Microb. Technol., v. 32, p. 312, 2003.

RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. Química Nova, v. 25, n. 2, p. 316-320, 2002.

RICCI, F.; AMINE, A.; PALLESCHI, MOSCONE, D. Prussian Blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability. Biosensors and Bioelectronics, v.18, n.2, p.165-174, 2002.

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

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. Biochim. Biophys. Acta . v. 30, p. 513, 1958.

SILVA, F. R. O.; MANSANA, R.; BELLINI, M. H.; COUTINHO, E. L.; SCHOR, N.; COURROL, N: *Tumor growth investigation using blood porphyrin auto-fluorescence*. In: XXX ENFMC, 2007, São Lourenço. Programa e Resumos XXX ENFMC, 2007.

SHARMA, M. K.; GOEL, A. K.; SINGH, L.; RAO, V. K. Immunologic biosensor for detection of *vibrio cholerae* O1 in environmental water samples. World journal of microbiology and biotechnology. v. 22, n. 11, p. 1155-1159, 2006.

SHYUAN, L. K.; HENG, L. Y.; AHMAD, M.; AZIZ, S. A.; ISHAK, Z. Screen-printed biosensor with alkaline phosphatase immobilized in sol-gel/chitosan film for the detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, Sens. Lett. v. 4, p. 17-21, 2006.

SINGH, S.; SINGHAL, R.; MALHOTRA, B. D. Immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase onto sol-gel films for application to cholesterol biosensor. Anal. Chim. Acta 582:335-343, 2007.

SOARES, C. M.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. Appl. Biochem. Biotechnol. v. 77, p. 745, 1999.

STRADIOTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical Sensors: A Powerful Tool in Analytical Chemistry. J. Braz. Chem. Soc., v. 14, n. 2, p.159-173, 2003.

STRYER, L. Bioquímica. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HOSS, M. J.J: Mol. Catal. B: Enzym. 2000, 9, 113.

WANG, Y. J: Lipase-catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. *Biotechnology and Bioengineering*. v.31, p.628-633, 1988.

WILL, J.; MITTERDORFER, A.; KLEINLOGEL, C.; PEREDNIS, D.; GAUCKLER, L. J. Fabrication of Thin Electrolytes for second-generation Solid Oxide Fuel Cells, *Solid State Ionics*, v. 131, n. 1, p.79-96, 2000.

WILLNER, I.; WILLNER, B. Biomaterials integrated with electronic elements: en route to bioelectronics. *Trends in Biotechnology*, v. 19, n. 6, 2001.

YIN, C.; LIU, T.; TAN, T.: Synthesis of vitamin A esters by immobilized *Candida* sp. Lipase in organic media. *Chinese J. Chem. Eng.*, v. 14, n.1, p. 81-86, 2006.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolvimento de um Biossensor Amperométrico Monoenzimático para Determinação de Triglicérides Utilizando a Tecnologia Screen-printed.

### **2.2 Objetivo Específicos**

- Caracterização físico-química e cinética da lipase;

- Produção dos “TIPs” via “screen-printing”;
- Imobilização da lipase nos TIPs;
- Estudo dos parâmetros eletroquímicos da lipase imobilizada;
- Estudo dos parâmetros eletroquímicos da lipase solúvel.

## **DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETERMINAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS**

**Leonardo Pereira de Siqueira<sup>1,2</sup>, Roberto Márcio Mota de Lima<sup>2</sup>, José Luiz de Lima Filho<sup>1,2</sup>, Neide Kazue Sakugawa Shinohara<sup>2,3</sup>, Maria do Carmo Barros Pimentel<sup>1,2</sup>, Maria da Paz Carvalho da Silva<sup>1,2</sup>.**

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica/Universidade Federal de Pernambuco (UFPE);

<sup>2</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami (LIKA), Universidade Federal de

Pernambuco; <sup>3</sup>Departamento de Tecnologia Rural, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

## RESUMO

A necessidade de métodos mais versáteis para a mensuração e monitoramento dos níveis séricos de lipídios tem estimulado a produção de uma grande variedade de novos métodos analíticos. O presente trabalho mostra o desenvolvimento de um biossensor monoenzimático para detecção de triglicerídeos empregando a tecnologia de “Screen-printing” através da qual, foram impressos os eletrodos de referência (Ag/AgCl) e o de trabalho contendo uma mistura de carbono e quitosana. A lipase foi imobilizada por adsorção no eletrodo de trabalho. A lipase solúvel, usando pNPM, apresentou pH ótimo de 8 e temperatura ótima de 32,5°C, mantendo cerca de 78,5% da atividade máxima a 25°C (temperatura operacional do biossensor). O  $K_m$  e  $V_{máx}$  para a lipase solúvel em relação ao pNPM foram de 0,95 mM e 25,51 U/mg proteína, respectivamente. No biossensor desenvolvido com apenas lipase imobilizada, usando trioleína como substrato, foram de 0,148 mM e 262,21  $\mu A/s$  e 0,304 mM e 85,07  $\mu A/s$  para a lipase solúvel e TIP sem enzima. Os resultados mostraram linearidade nas respostas de correntes para trioleína (0,25mM – 2mM), atestando a viabilidade do biossensor desenvolvido, utilizando unicamente a lipase imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho, podendo ser empregado eficientemente para a detecção de triglicerídeos.

**Palavras-chaves:** Biossensor eletroquímico, Lipase, Triglicerídeo, Screen-printing.

## ABSTRACT

Due to the necessity of more versatile methods for measure and accompany the lipid serum level, the production of several new analytical methods has been stimulated. This work shows a development of a monoenzymatic biosensor for triglycerides detection using Screen-printing technology, in which the reference electrodes (Ag/AgCl) and work electrode containing a mixture of carbon and chitosan 5% (w/w) were printed. The enzyme lipase was immobilized by adsorption on the work electrode. The soluble lipase presented optimum pH of 8.0, temperature of 32.5°C, keeping around 78% of its maximum activity at 25°C (biosensor work temperature).  $K_m$  and  $V_{max}$  for soluble lipase using pNPM as substrate were 0.95 mM and 25.51 U/mg protein, respectively. However for the developed biosensor with immobilized lipase only using triolein as substrate  $K_m$  and  $V_{max}$  were 0.148mM and 262.21  $\mu$ A/s, 0.34 mM and 85.07  $\mu$ A/s for soluble lipase and TIP without enzyme, respectively. The results showed linearity when triolein was used as substrate (0,25mM – 2mM) certifying the viability of the biosensor developed, using only immobilized lipase on the surface of work electrode, suggesting that it can be efficiently employed in the triglycerides detection.

**Keywords:** electrochemical biosensors, Lipase, Triglycerides

## 1. INTRODUÇÃO

O conhecimento do perfil lipídico está despertando grande interesse nos últimos anos por ser um importante parâmetro no diagnóstico clínico. A análise das concentrações de triglicérides em amostras de sangue é importante no diagnóstico e prevenção de um grande número de desordens clínicas como a hipertensão, arteriosclerose, doenças coronarianas e trombose cerebral, existindo correlação positiva entre seus níveis séricos e doenças cardiovasculares<sup>1</sup>.

Vários métodos analíticos podem ser usados para determinação de triglicerídeos incluindo colorimétrico, espectrométrico e métodos eletroquímicos<sup>2</sup>.

A necessidade de métodos analíticos mais versáteis para a mensuração e monitoramento dos níveis séricos de lipídeos tem estimulado a produção de uma grande variedade de técnicas analíticas. Biossensores representam uma ferramenta promissora para suplementar às técnicas existentes para determinação de triglicerídeos devido as suas características únicas, tais como: seletividade, relativo baixo custo de construção, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para monitoramento. Os métodos eletroanalíticos fazem uso das propriedades elétricas mensuráveis (corrente, potencial e carga) de um analito quando este é submetido a uma diferença de potencial entre eletrodos em uma cela eletroquímica. Essas medidas podem então ser relacionadas com algum parâmetro químico intrínseco do analito<sup>3</sup>.

Várias enzimas têm sido utilizadas em biossensores para determinar analitos de interesse clínico e ambiental. O acoplamento eletrônico entre as enzimas e o eletrodo nos biossensores pode ser realizado através de diferentes mecanismos: (i) pela eletroatividade do substrato ou produto enzimático (biossensores de primeira geração); (ii) pelo auxílio de mediadores, livres em solução ou imobilizados juntamente com a enzima (biossensores de segunda geração) e, finalmente, (iii) pela transferência eletrônica direta entre a superfície do eletrodo e o centro ativo da enzima (biossensores de terceira geração)<sup>4</sup>.

A voltametria é uma técnica eletroquímica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Essa técnica é classificada como dinâmica, pois a célula eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ( $i > 0$ ) que, por sua vez,

é medida em função de um potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar<sup>5</sup>. Assim, informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho ao se aplicar um potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar. O parâmetro ajustado é o potencial e o parâmetro medido é a corrente resultante, o registro da corrente em função do potencial é o voltamograma<sup>6</sup>.

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas da classe das hidrolases. Seus substratos naturais são os triglicerídeos e o seu modo de ação assemelha-se ao das esterases, porém sua atividade é muito aumentada quando situada na interface polar/apolar e apresenta maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa. As lipases são capazes de catalizar reações de hidrólise, esterificação, interesterificação, alcoólise, aminólise e lactonização. Esta flexibilidade aliada a diferentes possibilidades de especificidade de substrato existentes entre as diferentes lipases confere a estas enzimas um potencial enorme de aplicações<sup>7</sup>.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para determinação de triglicerídeos utilizando a enzima lipase imobilizada em pasta de carbono e quitosana contida sobre fitas poliméricas (TIPs).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAIS**

Os experimentos foram realizados utilizando-se lipase de *Candida cylindracea* adquirida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Folhas de polivinilálcool (PVA) comercial, Mw= 72.000 g/mol. Quitosana, Goma Arábica, Albumina e Trioleína foram obtidas da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA). Pasta de carbono e tintas

de prata e cloreto de prata, Achenson (Ontário, Canadá). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

## **2.2 METODOLOGIA**

### **2.2.1 Medida de atividade catalítica da lipase solúvel**

Foi preparada uma solução de *p*-nitrofenil miristato (*p*NPM) em isopropanol com concentração de 3mg/dL e dissolvida em uma solução emulsificante contendo Triton X-100(2g) e Goma Arábica (0,5g) em Tampão Tris-HCL(450mL) 50mM, pH 8. A mistura foi homogeneizada numa proporção de 1:9 v/v. Uma alíquota de 0,9mL desta mistura de reação foi adicionada de 0,1mL da solução de lipase (1mg/dl, da preparação comercial contendo 48,89 µg de proteína/mL). As absorvâncias foram medidas a 410 nm, contra um branco contendo 0,1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 8, em substituição da enzima, em intervalos de 15 segundos, ao longo de 2 minutos de reação. O coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol ( $\epsilon = 1,3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) foi usado para calcular a atividade enzimática. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a produção de 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto nas condições experimentais estabelecidas.

### **2.2.2 Determinação do Teor de Proteína**

Para determinação do teor de proteína nos ensaios enzimáticos foi usado o método de Lowry et al.<sup>8</sup>, tendo como padrão albumina de soro bovino.

### **2.2.3 Caracterização Físico-Química e Cinética da Lipase**

#### **2.2.3.1 Efeito do pH na atividade enzimática**

O meio reacional para este ensaio foi composto por *p*NPM preparado como descrito anteriormente utilizando-se os seguintes tampões (50mM): fosfato de Sódio: pH= 7,0; 7,5 e Tris-HCl: pH= 7,5; 8,0; 8,5. A atividade foi medida através do método de hidrólise do *p*NPM em temperatura ambiente (25°C) e mantendo-se constante a concentração da solução de lipase 1mg/dL.

### **2.2.3.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática**

O substrato foi preparado com descrito em 2.2.1 e a mistura reacional incubada em diferentes temperaturas (20, 25, 30, 35, 40 e 45°C). A atividade foi medida através do método da hidrólise do *p*NPM mantendo-se constante a concentração da solução de lipase 1mg/mL (preparação comercial), e a atividade calculada como descrito anteriormente.

### **2.2.3.3 Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática**

Uma solução de lipase com concentração de 1mg/mL (preparação comercial) foi colocada frente a diferentes concentrações de *p*NPM (1,5; 3; 4; 6; 8; 12; 24 mg%) para determinação dos parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{máx}$ ), através do software Enzfitter version 1.05.

## **2.3 Produção dos Tips**

Os biossensores foram construídos na forma de TIPS de polivinil álcool (PVA), sendo a área dos mesmos calculada e adaptada segundo a metodologia descrita por Mandong et al.<sup>9</sup>.

Os TIPS foram confeccionados com comprimento de 3 cm. Em sua superfície, duas linhas condutoras, com 1 mm de largura cada, foram impressas com Tinta de Prata

e secas em estufa a 60°C por 30 minutos. Após a secagem, o eletrodo de referência (Ag/AgCl) e o eletrodo de trabalho (carbono + quitosana 5%) foram impressos sobre cada uma das linhas condutoras, com comprimento de 0,8 cm. Os TIPS foram novamente secos em estufa a 60°C, por 30 minutos e armazenados em dessecador, conforme podemos observar na Figura 1.

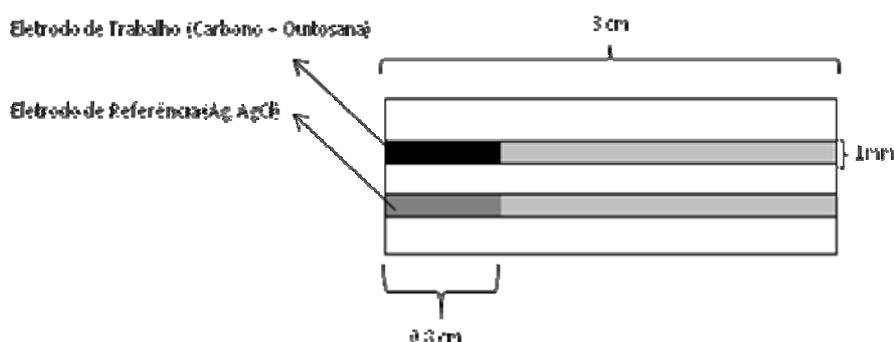


Figura 1. Modelo esquemático do TIPS.

## 2.4 Imobilização da Lipase nos TIPS

A imobilização da lipase no eletrodo de trabalho foi realizada colocando-se 10 µL da solução de lipase (28 mg/mL, preparação comercial) em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7), posteriormente permaneceu em repouso sob temperatura de 25°C durante 60 minutos para adsorção da enzima à pasta de carbono/quitosana 5%.

## 2.5 Preparação da Emulsão de Trioleína

A emulsão de trioleína foi preparada de acordo com Rejeb et al. (2007)<sup>10</sup>. Dois gramas de Trioleína foi homogeneizado com 3,5g de goma arábica e 30 mL de uma solução de albumina 6% (p/v) por aproximadamente 5 minutos. A suspensão foi ajustada para 100 mL com solução de albumina. A solução estoque é estável por 2 semanas a 4°C.

## **2.6 Medida da atividade catalítica da lipase no biossensor**

Soluções padrões, contendo diferentes concentrações de triglicerídeos (0,25 – 2,0 mM) foram colocadas em cubas de reação com capacidade de 3mL, nas quais mergulhou-se os TIPS contendo a lipase imobilizada. A resposta da reação enzimática no eletrodo de trabalho foi mensurada por voltametria cíclica (50mV/s) com aplicação de potenciais de -0,8V a +0,8V, contra um eletrodo de referência de Ag/AgCl. A atividade da lipase imobilizada foi calculada dividindo-se a variação de corrente observada para cada concentração de triglicerídeo versus o tempo. O  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram calculados através do software Enzfitter version 1.05.

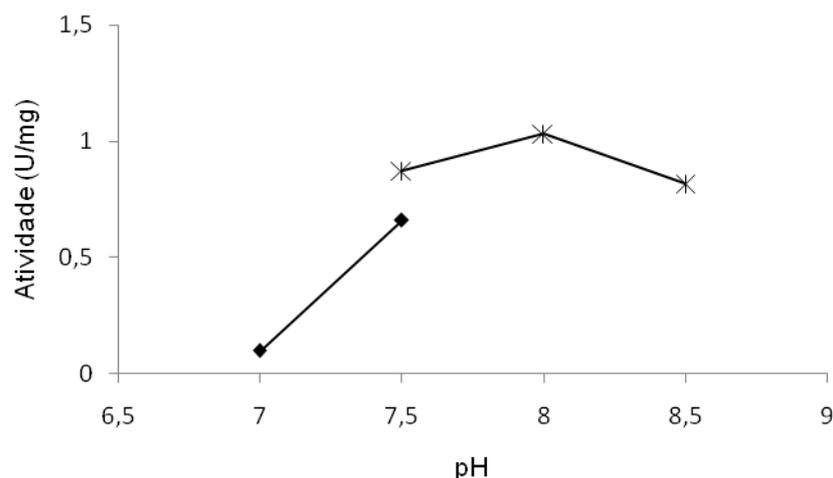
## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Determinação da atividade enzimática da lipase comercial**

#### **3.1.1 Efeito do pH na atividade enzimática**

Inicialmente a lipase de *Candida rugosa* foi testada utilizando o éster *p*NPM, para avaliar a sua aplicação no biossensor para triglicerídeo.

Nas condições estudadas a lipase solúvel apresentou máxima atividade para hidrólise do *p*NPM em pH 8,0 (15,52 U/mg proteína), como pode ser observado na Figura 2.



**Figura 2.** Efeito do pH na atividade da lipase solúvel utilizando o método do pNPM em tampões 50mM fosfato de sódio (pH 7; 7,5) e Tris HCl (pH 7,5; 8,0; 8,5). (  $\blacklozenge$  Tampão Fosfato de Sódio; \* Tampão Tris-HCl).

Pesquisadores utilizando *pNPP* como substrato encontraram os seguintes resultados para lipases de diferentes fontes microbianas. Pastore et al. (2003)<sup>11</sup> em estudo para purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase produzida por uma linhagem de *Rhizopus sp.* encontraram um pH ótimo em torno de 7,5 a temperatura de 37°C. Pimentel et al. (2007)<sup>12</sup> estudaram a lipase de *Candida rugosa* obtendo atividade máxima em pH 7,2 a 30°C. Maia et al. (1999)<sup>13</sup> obtiveram para lipase de *Fusarium solani*, um pH ótimo de 8,6 a 30°C. Pimentel et al. (2006)<sup>14</sup> verificaram que a atividade máxima de lipase de *Penicillium citrinum* ocorria na faixa de pH de 8 – 8,5 a 30°C. Bruno et al. (2005)<sup>15</sup> estudaram a lipase de *Mucor meihei*, determinando um pH ótimo na faixa de 7 a 8. Yi et al. (2009)<sup>16</sup> encontraram atividade máxima para lipase de *Candida rugosa* no pH 7. Ozyilmaz (2009)<sup>17</sup> observou um pH ótimo de 6,5 para lipase de *Candida rugosa*.

O pH ótimo encontrado neste trabalho foi maior que os publicados para *Candida rugosa* e ficou na faixa dos valores citados para lipases de outras fontes como pode ser observado na literatura acima citada.

### 3.1.2 Efeito da temperatura na atividade da lipase

A Figura 3 mostra que 32,5°C (média da faixa de 30 – 35°C) é a temperatura ótima para a lipase solúvel estudada, nas condições experimentais, apresentando cerca de 78,6% da atividade máxima a 25°C (temperatura usada para determinação da concentração de triglicerídeos usando o biossensor).

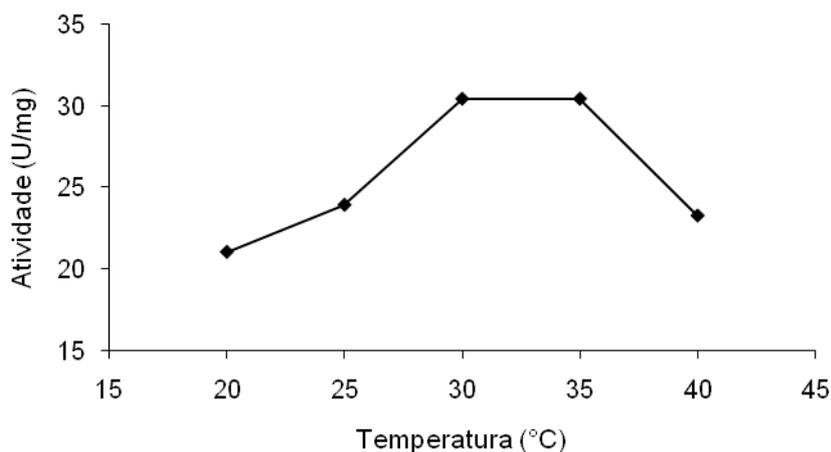


Figura 3. Efeito da temperatura na atividade da enzima solúvel em Tampão Tris-HCl 50mM, pH 8.

A temperatura ótima obtida foi similar a encontrada (30°C) por Ozyilmaz et al. (2009)<sup>17</sup> e menor que a publicada (50°C) por Yi et al. (2009)<sup>16</sup>, para lipase da mesma fonte. Entretanto ficou na mesma faixa de temperatura ótima para lipases de diferentes fontes. A temperatura ótima para lipase de *Rhizopus delemar* foi de 30°C, apresentando 80% de atividade entre as temperaturas de 25 e 38°C e nenhuma atividade acima de 45°C (Hass et al., 1992)<sup>5</sup>. Pastore et al. (2003)<sup>11</sup>, obtiveram para lipase de *Rhizopus sp.* o máximo de atividade lipolítica em 40°C. Maia et al. (1999)<sup>13</sup>, em estudo de produção de lipase a partir de *Fusarium solani*, encontraram temperatura ótima de 30°C. Pimentel e colaboradores (2006)<sup>14</sup> publicaram a temperatura ótima de 37°C para lipase de *Penicillium citrinum*.

### 3.1.3 Efeito da concentração de pNPM sobre a atividade da lipase

A Figura 4 mostra o gráfico de Michaelis-Menten para lipase solúvel. Verifica-se que o aumento da concentração de pNPM de 0,43mM a 1,71 mM resultou em um incremento significativo na velocidade de reação. Entretanto, em concentrações acima de 2,29 mM houve inibição da atividade lipolítica por excesso de substrato.

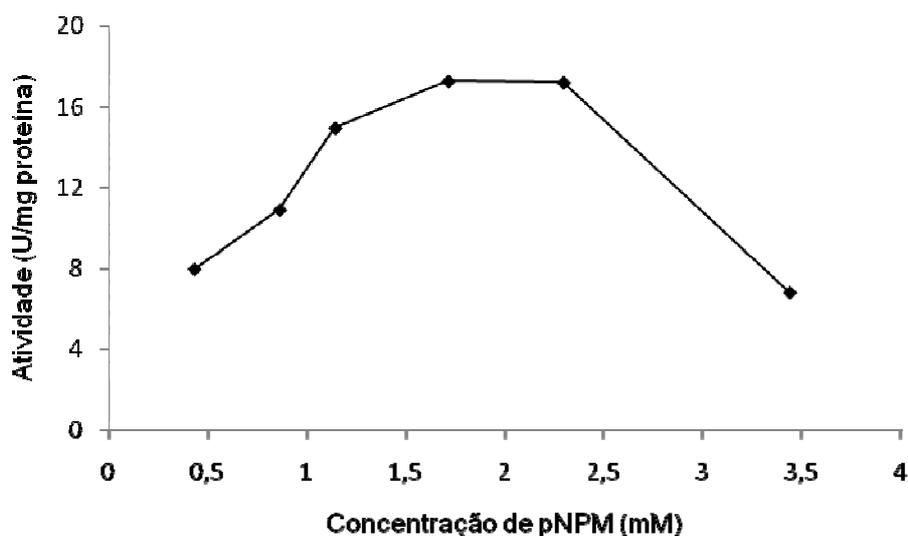
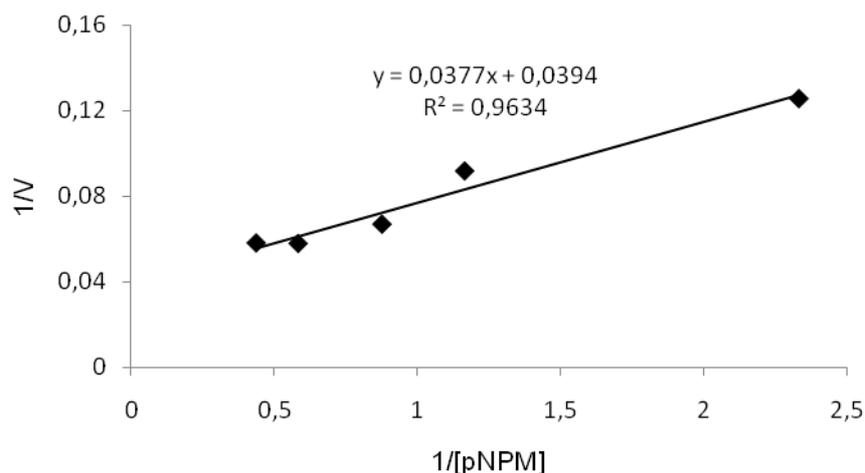


Figura 4. Efeito da concentração do substrato na atividade da enzima solúvel, utilizando o método do pNPM para medida da atividade, em tampão fosfato 50mM, pH 8, 25°C.

Foram obtidos os seguintes valores aparentes de  $K_m = 0,95$  mM e  $V_{m\acute{a}x} = 25,51$  U/mg proteína em pH 8 a 25°C (Figura 5).



**Figura 5.** Gráfico duplo-recíproco da atividade da lipase solúvel em diferentes concentrações de pNPM/Tris-HCl 50mM, pH8.

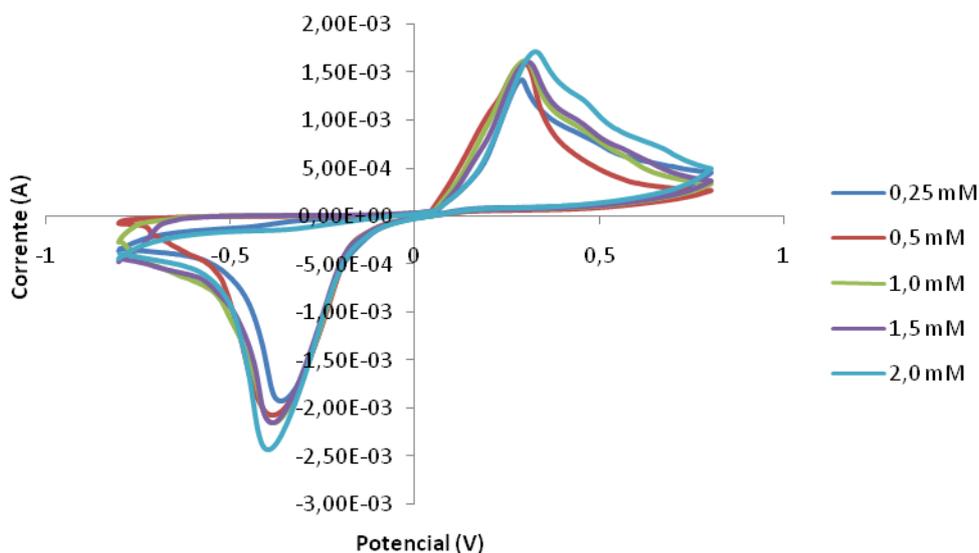
Ozyilmaz e colaboradores (2009)<sup>17</sup> encontraram o mesmo valor de  $K_m$  (0,9 mM), mas um  $V_{máx}$  (2,43 U/mg) 10 vezes menor, em pH 7 a 37°C usando *pNPP* como substrato. Pimentel et al. (2007)<sup>12</sup> encontraram valores aparente de  $K_m = 0,193$  mM e  $V_{máx} = 0,428$  U/mg para lipase solúvel de *Candida rugosa* utilizando como substrato o éster *pNPL* e  $K_m = 0,119$ mM e  $V_{máx} = 0,568$ U/mg quando foi utilizado o *pNPP* em pH 8 a 37°C. Ghiaci et al. (2009)<sup>18</sup> encontraram valores de  $K_m = 0,268$  e  $V_{máx} = 0,553$  U/mg para lipase livre de *Candida rugosa*. Todos os autores citados acima encontraram valores menores de  $K_m$  e  $V_{máx}$ . Entretanto, nenhum dos autores citados acima usou como substrato o *pNPM* para caracterizações físico-química e cinética da lipase.

### 3.2 Caracterização do Biossensor

Os estudos com o biossensor desenvolvidos foram realizados utilizando a lipase imobilizada no TIP, ou usando a lipase solúvel e o TIP sem enzima para captar os elétrons gerados na mistura de reação.

#### 3.2.1 Efeito da concentração de trioleína sobre a atividade da lipase imobilizada

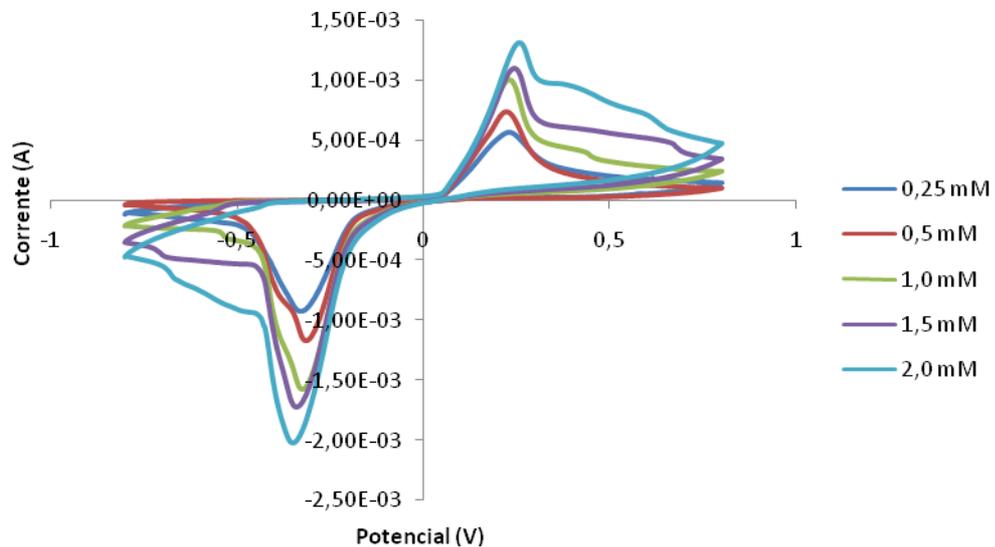
Inicialmente foi realizado um teste utilizando diferentes concentrações de trioleína em emulsão e um TIP sem enzima considerado controle. A Figura 6 apresenta os voltamogramas resultante da adição de diferentes concentrações de trioleína (0,25 – 2,0 mM) frente à um TIP sem lipase. Os estudos voltamétricos foram realizados com velocidade de varredura de 0,1V/s, potenciais variando de -0,8V a +0,8V e à temperatura de 25°C. A figura abaixo mostra que não houve proporcionalidade entre as concentrações de trioleína e a altura dos picos, comprovando a ausência de artefatos durante os voltamogramas com a lipase imobilizada.



**Figura 6. Voltamogramas resultante da adição de diferentes concentrações de trioleína (0,25 – 2,0 mM) frente à um TIP sem lipase imobilizada (TIP branco).**

A Figura 7 apresenta os voltamogramas resultantes da adição de diferentes concentrações de trioleína (0,25 mM – 2 mM), usando a lipase imobilizada no TIP, onde é possível observar o aumento proporcional da corrente com o aumento da concentração do analito. Os estudos voltamétricos foram realizados com velocidade de varredura de 50mV/s e potenciais variando entre -0,8V e +0,8V sobre os eletrodos.

Picos anódicos foram observados a um potencial de 0,25V com amplitude proporcional à concentração de triglicerídeos a qual eram expostos.



**Figura 7.** Estudo voltamétrico (50mV/s) e potenciais variando de -0,8 e +0,8V do biossensor de triglicerídeo, quando o biossensor foi imerso em soluções de triglicerídeo (0,25 mM – 2,0 mM).

A dependência linear dos picos de corrente com a concentração de triglicerídeo em solução possibilitou a construção de uma curva de trabalho, podendo então estabelecer uma relação entre a quantidade de elétrons produzidos durante a reação enzimática e a concentração de triglicerídeo da amostra a ser estudada (Figura 8).

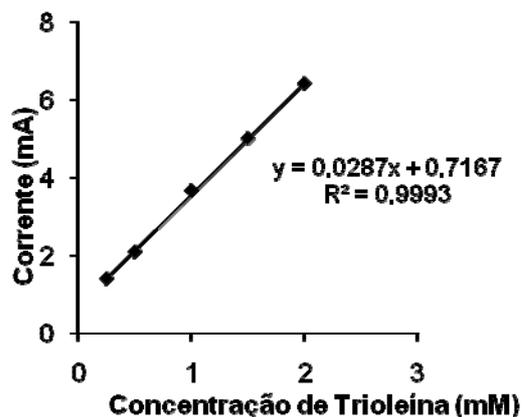


Figura 8. Curva padrão concentração de triglicerídeos variando de 0,25 a 2,0 mM em biossensor amperométrico baseada em lipase imobilizada em pasta de carbono e quitosana.

Houve uma linearidade na faixa de 0,25 mM a 2 mM entre a concentração de Trioleína e a corrente. Faixa similar de linearidade (0,2 mM a 3,5 mM) foi encontrada por Minakshi (2008)<sup>19</sup>, utilizando um biossensor amperométrico composto por lipase, glicerol cinase e glicerol-3-fosfato-oxidase imobilizadas em membrana de acetato de celulose ligada a um eletrodo de platina. Laurinavicius et al. (1996)<sup>20</sup> desenvolveram um biossensor amperométrico constituído por lipase e glicerol desidrogenase, obtiveram linearidade com concentrações de trioleato de glicerol até 0,75 mM. Rejeb et al. (2007)<sup>10</sup> construíram um biossensor amperométrico, para dosagem da atividade lipolítica e determinação de triacilglicerol, baseado em um eletrodo screen-printed modificado com Azul da Prússia, o qual foi constituído por lipase, glicerol desidrogenase e NADH oxidase e cofatores, mostrando uma linearidade de 0,01 mM a 0,1 mM de triglicerídeo. Como pode ser observado todos os biossensores acima citados são sistemas multienzimáticos, mais complexos e onerosos comparados com o biossensor desenvolvido no presente trabalho.

### 3.2.2 Efeito da concentração de trioleína sobre a atividade da lipase solúvel

A Figura 9 mostra os voltamogramas obtidos com a lipase solúvel. Observa-se que não houve uma linearidade entre a quantidade de corrente gerada durante a reação e a concentração de trioleína. Como o substrato utilizado encontra-se em emulsão, os elétrons formados durante a hidrólise dos triglicerídeos pela lipase, não são transferido diretamente ao TIP, e alguns se perdem na mistura de reação. Essa diminuição na transferência de elétrons quando usamos a lipase imobilizada ou a mesma solúvel, fica melhor evidenciada quando observamos na Tabela 1 o decaimento da atividade resultante da diminuição da captação dos elétrons pelo eletrodo.

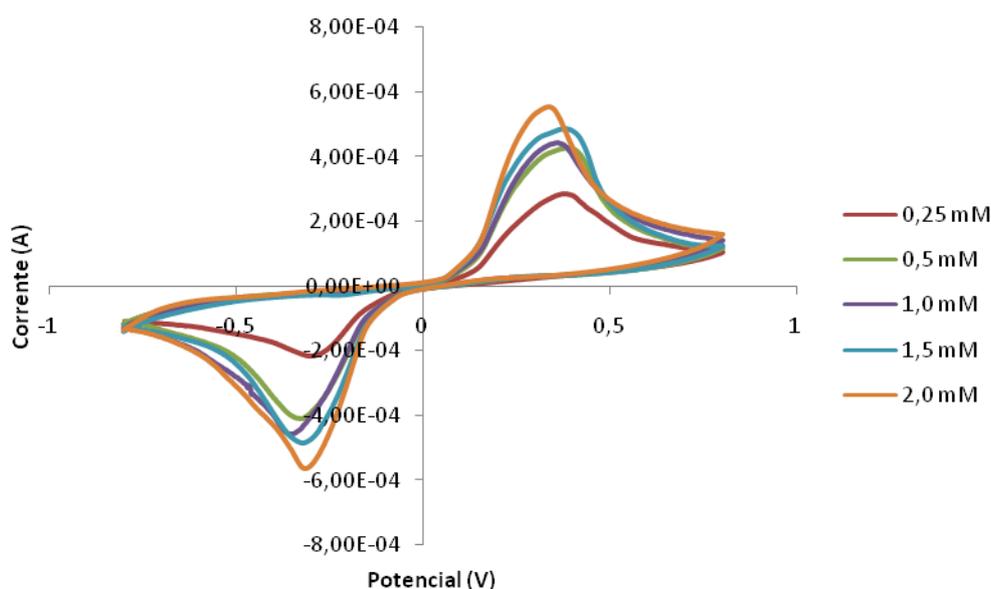


Figura 9. Estudo voltamétrico da lipase solúvel, com potenciais variando de -0,8 e +0,8V, quando o biossensor foi imerso em soluções de triglicerídeo (0,25 mM – 2,0 mM).

Na Figura 10 podemos observar que não houve linearidade entre os picos de corrente e a concentração de triglicerídeo, não nos permitindo estabelecer uma relação entre a quantidade de elétrons produzidos durante a hidrólise e a concentração de triglicerídeo da amostra.

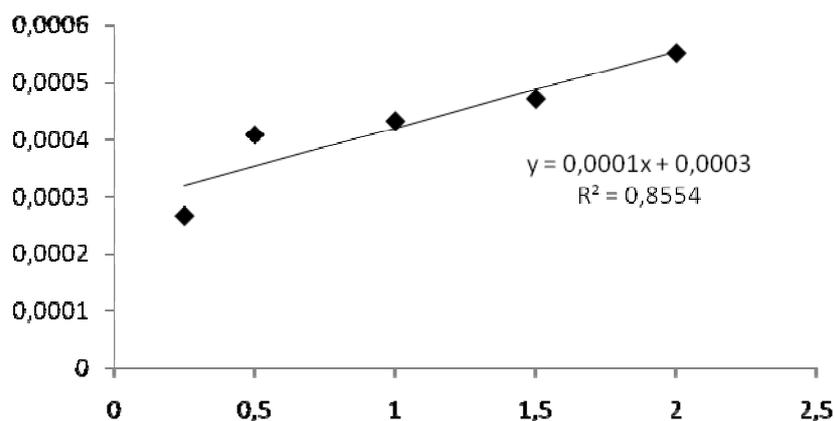


Figura 10. Curva padrão concentração de triglicerídeos variando de 0,25 a 2,0 mM em biossensor amperométrico com lipase solúvel.

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos das atividades lipolíticas utilizando trioleína em emulsão e lipases imobilizada e solúvel. Podemos observar que os valores de atividade lipolítica obtidos com a lipase imobilizada no TIP foram cerca de 4 vezes maiores que os encontrados utilizando a lipase solúvel no mesmo sistema. Com esses resultados podemos observar que a lipase imobilizada no TIP foi mais eficiente.

Tabela 1. Atividades das lipases imobilizada e solúvel em função da concentração de trioleína.

Concentração de Trioleína	Lipase Imobilizada no TIP Atividade (μA/s)	Lipase Solúvel Atividade (μA/s)
0,25 mM	158,74	39,85
0,5 mM	218,91	54,74
1,0 mM	213,21	60,96
1,5 mM	228,56	63,52
2,0 mM	257,91	82,48

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1 foram calculados os valores aparentes de  $K_m$  e  $V_{máx}$  para as lipases imobilizada e solúvel. Os valores encontrados foram: para a lipase imobilizada,  $K_m = 0,148$  mM e  $V_{máx} = 262,21$  μA/s; para a lipase solúvel,  $K_m = 0,304$  mM e  $V_{máx} = 85,07$  μA/s. O valor de  $K_m$

encontrado para a enzima solúvel no biossensor foi cerca de 3 vezes maior que o obtido com a enzima imobilizada no TIP mostrando a dificuldade de interação entre a enzima e o substrato em macroemulsão e comprovando a eficiência do biossensor desenvolvido contendo a lipase imobilizada.

#### **4. CONCLUSÃO**

O biossensor para triglicerídeos utilizando a tecnologia “screen-printed” e apenas lipase imobilizada mostrou ser um sistema mais simples e de menor custo quando comparado com outros biossensores multienzimáticos para triglicerídeos. O biossensor apresentou linearidade nos resultados obtidos, podendo ser eficientemente empregado para a determinação de triglicerídeos.

#### **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Xu, D. K.; Huang, K.; Liu, Z. H.; Li, Y. Q. Ma, L. R.; *Electroanalysis*. **2005**, 13, 882.
2. Zinni, M. A.; Aljinovic, E. M.; Iglesias, L. E.; Iribarren, A. M. *Química Nova*, **2004**, 27, 496.
3. Rosatto, S. S.; Freire, R. S.; Durán, N.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova*, **2001**, 24(1),77-86.
4. Gilmartin, M. A. T.; Hart, J. P. *Analyst*, **1995**, 120, 1029-1045.
5. Hass, M. J.; Cichowicz, D. J.; Bailey, D. G. *Lipidis*, 1992, 27(8), 571-576.
6. Perez, V. H.; Silva, G. S.; Gomes, F. M.; DE Castro, H. F.; *Biochem. Eng. J.*, 2007, 34, 13.
7. Bhatia, R. B.; Brinker, C. J.; Gupta, A. K.; Singh, A. K. *Chem. Mater.*, **2000**, 12, 2434-2441.

8. Lowry, O. H., N. J.; Rosebrough, A.L.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.*, **1951**, 193, 265-275.
9. Madong, G.; Yanqing, L. Hongxia, G.; Xiaoqin, W.; Lifang, F. *Bioelectrochem.*, **2007**, 70, 245-249.
10. Rejeb, I. B.; Arduini, F.; Amine, A.; Gargouri, M.; Palleschi, G. *Analytica Chimica Acta*, **2007**, 594, 1-8.
11. Pastore, G. M.; Costa, V. S. R.; Koblitiz, M. G. B. *Cienc. Tecnol. Aliment*, **2003**, 23, 135-140.
12. Pimentel, M. C. B.; Leão, A. B. F.; Melo, E. H. M.; Lima-Filho, J. L. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, **2007**, 35, 1-15.
13. Maia, M. D. M.; Morais, M. M. C.; Morais Jr., M. A.; Melo, E. H.; Lima-Filho, J. L. *Revista de Microbiologia*, **1999**, 30, 304-309.
14. Pimentel, M. C. B.; Leao, A. B. F.; Melo, E. H. M.; Ledinghan, W. M.; Lima-Filho, J. L.; Kennedy, J. F. *Biotechnology*, **2006**, 5(3), 228-233.
15. Bruno, L. M.; Pinto, G. A. S.; Castro, H. F.; Lima-Filho, J. L.; Melo, E. H. M. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **2004**, 20, 371-375.
16. Yi, S.; Noh, J. M.; Lee, Y. S. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2009**, 57, 123-129.
17. Ozyilmaz, G. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2009**, 56, 231-236.
18. Ghiaci, M.; Aghaei, H.; Soleimanian, S.; Sedaghat, M. E. *Applied Clay Science*, **2009**, 43, 289-295.
19. Minakshi, C. S. P. *Sensors and Actuators*, **2008**, 133, 251-255.

20. Laurinavicius, V.; Kurtinaitiene, B.; Gureviciene, V.; Boguslavsky, L.; Geng, L.; Skothein, T. *Analytica Chimica Acta*, **1996**, 330, 159-166.

## CONCLUSÕES

- Nas condições estudadas a lipase solúvel apresentou máxima atividade para hidrólise do *p*NPM em pH 8,0;

- Foi encontrada uma temperatura ótima de 32,5°C (média da faixa de 30 – 35°C) para a lipase solúvel estudada, nas condições experimentais, apresentando cerca de 78,6% da atividade máxima a 25°C (temperatura usada para determinação da concentração de triglicerídeos usando o biossensor);
- O aumento da concentração de *p*NPM de 0,43mM a 1,71 mM resultou em um incremento significativo na velocidade de reação. Entretanto, em concentrações acima de 2,29 mM houve inibição da atividade lipolítica por excesso de substrato;
- Houve uma linearidade na faixa de 0,25 mM a 2 mM entre a concentração de Trioleína e a corrente formada durante a hidrólise do triglicerídeo, para a lipase imobilizada;
- Não houve linearidade entre os picos de corrente e a concentração de triglicerídeo, não nos permitindo estabelecer uma relação entre a quantidade de elétrons produzidos durante a hidrólise e a concentração de triglicerídeo da amostra, para a lipase solúvel;
- Quanto aos valores de atividade lipolítica obtidos nesse estudo, foi observado que as atividades da enzima imobilizada no TIP foi cerca de 4 vezes maior que os encontrados utilizando a lipase solúvel no mesmo sistema;
- O valor de  $K_m$  encontrado para a enzima solúvel no biossensor foi cerca de 3 vezes maior que o obtido com a enzima imobilizada no TIP, mostrando a dificuldade de interação entre a enzima e o substrato em macroemulsão, o que comprova a maior eficiência do biossensor desenvolvido contendo a lipase imobilizada.



## ANEXO

**química nova**

ISSN 0100-4042 *versão impressa*

ISSN 1678-7064 *versão online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

**Objetivo e política editorial**

Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

**Artigos Originais** (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental, etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho.

**Artigos de Revisão** (em português, inglês ou espanhol): destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, contendo uma visão crítica, com o objetivo principal de beneficiar clientela formada por pós-graduandos e não-especialistas da área. O [Corpo Editorial](#) de QN poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão. É desejável que o autor tenha publicações na referida área.

**Artigos de Divulgação** (em português, inglês ou espanhol): apresentação de algum aspecto ou área de Química, redigido de forma didática, com o objetivo de beneficiar clientela formada por estudantes de graduação, pós-graduação, não-especialistas na área, professores secundários de Química, etc.

**Artigos sobre Educação** (em português ou espanhol): refere-se a trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação.

**Notas Técnicas** (em português, inglês ou espanhol): destinados à comunicação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito.

**Assuntos Gerais** (em português, inglês ou espanhol): abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química, etc.

### **Preparação de manuscritos**

Todos os trabalhos deverão ser enviados em 3 vias, digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc. O disquete (3 1/2") ou CD deverá ser enviado somente após a aceitação do trabalho pela Editoria. Todas as páginas devem ser numeradas, inclusive as de figuras, tabelas, gráficos, esquemas, etc.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores (consultar o último número da revista). Havendo autores com diferentes endereços estes deverão se seguir imediatamente ao nome de cada autor. Os autores devem ser agrupados por endereço. Indicar com asterisco(\*) o autor para correspondência, colocando seu e-mail no rodapé desta página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (ABSTRACT), com no máximo 100 palavras, e a indicação de 3 keywords, também em inglês.

As figuras (gráficos, esquemas, etc.) deverão ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). No disquete ou CD, as figuras devem ser enviadas em arquivo eletrônico separado do texto (a imagem aplicada no processador de texto não significa que o original está copiado) e escaneadas em alta resolução (*800 dpi/bitmap para traços*) com extensão *tif* ou *jpg*. As fotos ou desenhos com cor (*300 dpi/grayscale*) com extensão *tif/jpg*, para não termos problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: *cdr, eps, cdx* ou *opj*. No caso de não ser possível a entrega do arquivo eletrônico das figuras, os originais devem ser enviados em papel vegetal ou impressora a laser para serem escaneados diretamente; as fotografias deverão ser em preto e branco. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente. Considerar que as figuras deverão ter largura de uma coluna (8,5 cm) ou de 2 colunas (17,5 cm). Figuras coloridas tem custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores devem providenciar a permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha o copyright e enviar à editoria de QN junto com a versão final do manuscrito.

As referências serão numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes; a lista de referências será colocada no final do texto. As legendas das figuras devem ser colocadas em folha à parte, separadas das figuras. A seguir, devem ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. No texto, apenas indicar a inserção de cada um(a).

## **REFERÊNCIAS**

Revistas:

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.

No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

2. Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

3. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

4. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**. (CA 91:P193174v)

5. Kadin, S.B.; *US pat.* 4,730,004 **1988**. (CA 110:P23729y)

6. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI* 9.604.468-3, **1999**.

Livros:

7. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

8. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

9. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

10. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

11. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.sbq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo.  
Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido.  
Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

**Quando o trabalho for redigido em idioma inglês, os autores são solicitados a se remeterem às normas do Journal of the Brazilian Chemical Society.**

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de

compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em Q.N. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

### ***SUBMISSÃO DOS ARTIGOS***

Os manuscritos devem ser enviados para

Química Nova

Sociedade Brasileira de Química, Caixa Postal 26037

05513-970 São Paulo - SP

Devem ser acompanhados de carta indicando: a) modalidade do artigo; b) nomes e endereços de três ou quatro possíveis assessores e c) o e-mail do autor para correspondência.

### ***MANUSCRITOS REVISADOS***

Manuscritos enviados aos autores para revisão devem retornar à Editoria dentro de prazo máximo de três meses ou serão considerados retirados.

*A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original ao nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por, no mínimo, dois consultores, indicados pela Editoria.*