
THIAGO MARTIMIANO DO PRADO

**Desenvolvimento de um biossensor para a detecção de antibióticos β -
lactâmicos no leite cru.**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Química, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para a obtenção do
título de mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Del Pilar T. Sotomayor

Araraquara

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

P896d Prado, Thiago Martimiano do
Desenvolvimento de um biossensor para a
detecção de
antibióticos β -lactâmicos no leite cru / Thiago
Martimiano
do Prado. – Araraquara : [s.n], 2012
77 f. : il.

Paulista, Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual
Instituto de Química
Orientador: Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

1. Química analítica. 2. β -lactamase. 3.
Biossensores.
4. Penicilina G. I. Título.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Thiago Martimiano do Prado

Data de nascimento: 18 de janeiro de 1984

Naturalidade: Brasileira

Estado civil: Solteiro

FORMAÇÃO

Ensino Médio

E. E. Professor José Juliano Neto, São Carlos – SP.

Período: 1999 a 2001.

Graduação

Licenciatura em Química – Instituto de Química da UNESP - Araraquara.

Período: 02/2005 a 12/2009

Pós-Graduação

Mestrado em Química, realizado no Departamento de Química Analítica do Instituto de Química (UNESP), sob orientação da Prof^a. Dr^a. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor.

Período: 03/2010 a 03/2012.

Titulo do Projeto: “Desenvolvimento de um biossensor para a detecção de antibióticos β -lactâmicos no leite cru”.

Disciplinas Cursadas: Quimiometria (Conceito A), Enzima como ferramenta analítica (Conceito B), Alguns métodos instrumentais em eletroanalítica I (Conceito C) e Tópicos especiais: Eletroanalítica de Biocombustíveis (Conceito A).

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- Prado, T.M.; Sotomayor, M.D.P.T.; “Desenvolvimento de biossensor amperométrico para detecção de antibióticos β -lactâmicos, visando aplicação em leite de vaca cru”. XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Bento Gonçalves – RS, 2011.
- Prado, T.M.; Cesário, F.H.; Hojo, O.; “Biodiesel – Produção utilizando óleo de soja e etanol, acompanhamento metrológico”. XIX Congresso de Iniciação Científica UNESP, Presidente Prudente – SP, 2007.
- Prado, T.M.; Cesário, F.H.; Hojo, O.; “Biodiesel a partir de óleo de soja com o uso de etanol – Acompanhamento metrológico da produção”, 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia – SP, 2007.
- Cesário, F.H.; Prado, T.M.; Hojo, O.; “Biodiesel de soja produzido com metanol - Uma proposta de experimento didático simples com acompanhamento metrológico.”, 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia – SP, 2007.
- Prado, T.M.; Cesário, F.H.; Hojo, O.; “Produção de Biodiesel - Um experimento didático propondo a interdisciplinaridade com assuntos abordados na Educação Básica.”, V Evento de Educação em Química, Araraquara – SP, 2007.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia - SP, 2007.
- V Evento de Educação em Química, Araraquara - SP, 2007.
- XIX Congresso de Iniciação Científica UNESP, Presidente Prudente – SP, 2007.
- 7ª Jornada Científica da UFScar, São Carlos – SP, 2007.
- XXXVI Semana da Química, Araraquara – SP, 2006.
- Comemoração do dia do Químico, Araraquara – SP, 2006.
- XXXV Semana da Química, Araraquara – SP, 2005.

BOLSAS RECEBIDAS

- Bolsa de Estágio na Empresa Nestlé Brasil LTDA., Unidade de Araraquara – SP – período de 12/2007 a 01/2010.
- Bolsa de Apoio ao Estudante – PAE/PROEX (BAE) – período de 04/2006 a 12/2007 – Departamento de Biotecnologia.
- Bolsa de Apoio ao Estudante – PAE/PROEX (BAE) – período de 04/2005 a 12/2005 – Departamento de Físico-Química.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

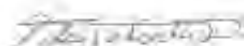
- Empresa: Nestlé Brasil LTDA., Unidade de Araraquara – SP. Função: Analista de Higiene. Período: 08/2011 a atual.
- Empresa: Nestlé Brasil LTDA., Unidade de Araraquara – SP. Função: Auxiliar Qualificado de Garantia da Qualidade (Microbiologia / Físico-Química). Período: 01/2010 a 07/2011.
- Empresa: Tecumseh do Brasil LTDA., São Carlos – SP. Função: Auxiliar de produção. Período: 01/2003 a 03/2004.

THIAGO MARTIMIANO DO PRADO

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 25 de abril de 2012.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Maria Del Pilar Taboada Solomayor (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Marcos Roberto de Vasconcelos Lanza
Instituto de Química – USP, São Carlos



Prof. Dr. André Luiz dos Santos
Faculdade de Ciências Integradas do Pontal – UFU, Ituiutaba

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado...

Aos meus pais José Martimiano do Prado e Lusía Aparecida Bacchini do Prado, os quais investiram em minha educação proferindo valiosas lições de disciplina, honestidade, humildade e perseverança.

Minhas irmãs Con, Angela e Sandra que sempre torcem para o meu sucesso e são provas vivas da existência do amor incondicional.

Meus sobrinhos Victor, Enzo, Nathan e a sobrinha Júlia, sempre proporcionando momentos divertidos em minha vida.

Minha avó Isaura e em memória de minha avó Maria Joanna.

Minha namorada Carolina Viviani Clápis, companheira, incentivadora e paciente nos momentos difíceis.

Aos amigos Atílio e Rafaela.

AGRADECIMENTOS

Por ter concluído este trabalho de mestrado agradeço...

Minha orientadora, Maria Del Pilar Taboada Sotomayor pelo incentivo e compreensão sobre a desafiadora jornada conciliando as atividades acadêmicas e a atividade profissional na indústria.

A minha chefe Mariane Ramos representando a Nestlé - Unidade de Araraquara que permitiu a minha participação em atividades durante a jornada de trabalho para a integralização dos créditos do programa de mestrado.

Ao amigo Ademar Wong pelo processo de integração e acompanhamento de minhas atividades iniciais dentro do Grupo de Eletroanalítica.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em participar desta etapa importante de minha carreira e amadurecimento profissional.

Ao Instituto de Química de Araraquara.

Ao CNPQ e a FAPESP, pelos recursos financeiros que possibilitaram o bom andamento deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho mostra o desenvolvimento do primeiro biossensor descrito na literatura para determinação de antibióticos β -lactâmicos, usando pasta de carbono modificada com a enzima β -lactamase, e sua aplicação em amostras de leite de vaca *in natura*.

A partir de estudos prévios de otimização da preparação do biossensor, o grafite em pó foi ativado com carbodiimida para permitir a ligação covalente da enzima β -lactamase que, junto com o mediador de elétrons ftalocianina de cobalto ofereceram variações na corrente catódica na presença da penicilina G, sendo esta escolhida para representar os antibióticos β -lactâmicos.

Utilizando este procedimento para a construção dos biossensores, foi possível registrar voltamogramas cíclicos e amperogramas que permitiram quantificar a benzilpenicilina (penicilina G) em condições de análise também otimizadas, que incluíram estudo da quantidade de mediador na pasta; o pH, tipo e concentração do eletrólito usado para realização das medidas e o potencial aplicado na amperometria.

Com o método otimizado foi possível detectar penicilina G em amostras de leite *in natura*, fortificadas com o antibiótico, com alta exatidão (erro relativo de 1%) e boa precisão (desvio padrão relativo de 8,3%, $n = 3$), mostrando que o biossensor desenvolvido é uma ferramenta promissora para detecção de penicilinas, e que ao serem realizados mais estudos para diminuir seu limite de quantificação, poderá se tornar uma um método de análise alternativo aos kits comerciais existentes.

Palavras chaves: β -lactamase, biossensores, penicilina G, leite *in natura*.

ABSTRACT

This work describes the development of the first biosensor described in the literature for the determination of β -lactam antibiotics using a carbon paste electrode modified with the enzyme β -lactamase, and its application in samples of fresh cow's milk.

After optimizing the biosensor preparation procedure, the graphite powder was activated with carbodiimide to allow covalent binding of the enzyme β -lactamase, which together with the electron mediator, cobalt phthalocyanine, offered variations in cathodic currents in the presence of penicillin G, which was chosen as representative of the β -lactam antibiotics.

Using this procedure for the construction of biosensors, it was possible to record cyclic voltammograms and amperograms that enabled quantification of benzylpenicillin (penicillin G) under analytical conditions that had been optimized in terms of the amount of mediator in the paste, the pH, the type and concentration of the electrolyte used in the measurements, and the applied amperometric potential.

With the optimized method, it was possible to detect penicillin G in samples of fresh milk fortified with the antibiotic, with high accuracy (error of 1%) and adequate precision (RSD of 8.3%, $n=3$), demonstrating that the proposed biosensor is a promising tool for the detection of penicillins. Once quantitation limits have been further improved, the analytical method could become an alternative to existing commercial kits.

Keywords: β -lactamase, biosensors, penicillin G, fresh milk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura genérica de alguns antibióticos β -lactâmicos. (A) Penicilinas (exemplo: benzilpenicilina, ampicilina, amoxilina), (B) Cefalosporinas, (C) Cefamicinas (exemplo: cefoxitina), (D) Cefotaxima (oximino, cefalosporinas).	25
Figura 2: Estrutura da benzilpenicilina (Penicilina G).....	26
Figura 3: Mecanismo de ação de β -lactamases das classes A,C e D sobre uma penicilina.	27
Figura 4: Mecanismo de ação das β -lactamases de classe B sobre uma penicilina.	28
Figura 5: Visualização do sítio ativo binuclear da β -lactamase dependente de zinco ou β -lactamase – Classe B, sintetizada pelo <i>Bacillus cereus</i> . Destacando os átomos de Zn (a_a e a_b) e os resíduos de SO_4^{2-} (b_a e b_b) que fazem parte das duas cadeias A e B que constituem o sítio ativo binuclear da enzima. Disponível em: http://www.pdb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1BC2&bionumber=1	29
Figura 6: Dependência da velocidade de reação (em unidades de V_R) com a concentração do substrato $[S]$. V_M é a velocidade máxima e K_{MM} é a constante de Michaelis – Menten.	31
Figura 7: Esquema genérico dos biossensores mais utilizados.....	34
Figura 8: Estrutura química de alguns reagentes multifuncionais usados na imobilização de enzimas em suportes sólidos. (A) glutaraldeído; (B) N,N' -hexametilenobisiodoacetamida; (C) diazobenzidina (D) diazobenzidina-3,3'-dianisidina.	37
Figura 9: Estrutura da Ftalocianina de Cobalto (CoPc).....	39

Figura 10: Etapas do ensaio utilizando o CMT. Tempo total do teste 3 horas.	41
Figura 11: Pasta de carbono modificada e o correspondente eletrodo para a realização das medidas.....	44
Figura 12: Representação do sistema de medidas eletroquímicas adotado (ER: eletrodo de referência, ET: eletrodo de trabalho e CE: contra eletrodo).....	47
Figura 13: Resposta do biossensor construído à base de ligação cruzada com glutaraldeído, β -lactamase e ferroceno, $\nu = 20 \text{ mV.s}^{-1}$	51
Figura 14: Resposta do biossensor construído à base de ligação cruzada com glutaraldeído, β -lactamase e CoPc, $\nu = 20 \text{ mV.s}^{-1}$	52
Figura 15: Voltamogramas obtidos para o biossensor com β -lactamase imobilizada por ligação covalente usando ferroceno como mediador de elétrons. Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1}	54
Figura 16: Voltamogramas obtidos para o biossensor com β -lactamase imobilizada por ligação covalente usando CoPc como mediador de elétrons. (a) pasta de carbono modificada apenas com enzima; (b) sensor em (a) + substrato; (c) biossensor à base de pasta modificada com CoPc e β -lactamase; e (d) biossensor em (c) + penicilina G. Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), $4,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Penicilina G e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1}	54
Figura 17: Mecanismo proposto para a ação da CoPc como mediador de elétrons no biossensor.....	56
Figura 18: Amperogramas obtidos em -100 mV , com um eletrodo de pasta de carbono funcionalizada com CDI (A) e com o biossensor proposto (B). Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), e adições sucessivas de $9,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de substrato.	57

Figura 19: Amperogramas obtidos no estudo de potencial aplicado ao biossensor. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0), e adições sucessivas de 9,9 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de substrato.	58
Figura 20: Influência do pH na sensibilidade do biossensor.	59
Figura 21: Perfil de resposta do sensor nas condições otimizadas. Adições sucessivas de 100 µmol L ⁻¹ de Penicilina G em uma solução tampão fosfato 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,5).	61
Figura 22: Curva analítica típica plotada com o gráfico da Figura 21.	61
Figura 23: Voltametrias cíclicas obtidas através de diferentes velocidades de varredura. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,5) e K ₃ [Fe(CN) ₆] = K ₄ [Fe(CN) ₆] = 2,5 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	63
Figura 24: Perfil linear da variação de corrente (Δi_{pa}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($\nu^{1/2}$).	64
Figura 25: Perfil hiperbólico do biossensor à base β -lactamase.	66
Figura 26: Perfil do comportamento do biossensor pelo duplo-recíproco	66
Figura 27: Curva analítica usada na aplicação do biossensor na análise de leite de vaca cru.	68
Figura 28: Sinais obtidos para as três replicatas da amostra e comparação com soluções padrão de penicilina G, na concentração de 3,00 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ na cela de medida.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição média do leite de vaca ¹	18
Tabela 2: Principais produtores de leite de vaca no mundo.	20
Tabela 3: Mediadores de elétrons testados empregando a técnica de voltametria cíclica.....	55
5	
Tabela 4: Condições otimizadas para a determinação de Penicilina G usando biossensor à base de pasta de carbono modificada com grafite funcionalizado com CDI e CoPc.	60
Tabela 5: Características analíticas mostradas pelo biossensor para determinação de Penicilina G.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CBT: Contagem Bacteriana Total.

CCS: Contagem de Células Somáticas.

CDI: N-ciclohexil-N'-(2-morfolimetil) carbodiimida.

CE: contra eletrodo.

CMT: Copan Milk Test.

CoPc: Ftalocianina de cobalto.

EQM: Eletrodos Quimicamente Modificados.

ER: eletrodo de referência.

ET: eletrodo de trabalho.

HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid.

IN 51: Instrução Normativa nº 51.

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

NTC: nanotubos de carbono.

PAMvet: Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal.

PBS: phosphate buffered saline.

PIPES: 1,4-p-perazinediethanesulfonic acid sodium salt.

PNQL: Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite.

RIISPOA: Regulamentação Industrial de Inspeção Sanitária e Produtos de Origem Animal.

RSD: desvio padrão relativo.

TCNQ: tetracianoquinodimetano.

TRIS: tris(hidroximetil) aminometano.

UME: ultramicroeletrodo.

Ag/AgCl: eletrodo de referência prata – cloreto de prata.

i : corrente elétrica.

I_{pa} : corrente de pico anódico.

I_{pc} : corrente de pico catódico.

I_c : corrente capacitiva.

I_F : corrente faradaíca.

K_{MM} : constante de Michaelis-Menten.

K_{MM}^{app} : constante aparente de Michaelis-Menten.

v : velocidade de varredura.

V_M : velocidade máxima.

V_R : velocidade de reação.

SUMÁRIO

CURRICULUM VITAE	i
DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Leite	18
1.2. Qualidade do leite e legislação	20
1.3. Mastite	21
1.4. Antibióticos no leite	22
1.4.1. ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS.....	23
1.5. β -LACTAMASES.....	26
1.6. Biossensores	29
1.6.1. TIPOS DE BIOSSENSORES	33
1.6.2. (BIOS)SENSORES AMPEROMÉTRICOS	35
1.7. Modificação de eletrodos na construção de biossensores enzimáticos	35
1.7.1. LIGAÇÃO COVALENTE	36
1.7.2. LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA	37
1.8. Mediadores de elétrons.....	38

1.8.1. FTALOCIANINA DE COBALTO	39
1.9. Iniciativa para o desenvolvimento do trabalho	40
2. OBJETIVO	42
2.1. Objetivos específicos	42
3. PARTE EXPERIMENTAL	43
3.1. Reagentes e Soluções	43
3.2. Construção dos biossensores empregando a técnica de ligações covalentes cruzadas: Método I.....	43
3.3. Construção dos biossensores empregando a técnica de ligações covalentes: Método II	45
3.4. Medidas Eletroquímicas	46
3.5. Otimização das condições de preparação e análise do biossensor	47
3.6. Avaliação da área ativa do biossensor proposto.....	48
3.7. Aplicação do biossensor na detecção de Penicilina G em leite de vaca cru. 48	
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Otimização do método de imobilização e escolha do mediador de elétrons. 49	
4.1.1. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA POR LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA COM GLUTARALDEÍDO: MÉTODO I	49
4.1.2. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA POR LIGAÇÃO COVALENTE: MÉTODO II ...	52
4.2. Otimização da preparação e resposta do biossensor	56
4.3. Perfil de resposta para o biossensor otimizado	60
4.4. Estimativa da área eletroquimicamente ativa do biossensor	63
4.5. Comportamento da cinética enzimática no biossensor	65
4.6. Aplicação do biossensor em leite de vaca cru.	67
5. CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	72

Anexo – Resumo aceito no 63 rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, que será realizado em Agosto de 2012.	75
--	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leite

O leite bovino possui grande número de constituintes distintos, embora a maioria ainda não tenha sido identificada¹. A quantidade de leite produzida e sua composição apresentam variações ocasionadas por fatores como: espécie, raça, fisiologia (individualidade, diferenças entre os quartos do úbere, idade), alimentação, estações do ano, doenças, período de lactação, ordenhas (número, intervalo e processo), fraudes e adulterações¹.

A composição do leite é determinante para a sua qualidade nutricional e adequação para o processamento e consumo humano. Destaca-se como principais constituintes do leite: água, gordura, vitaminas, proteínas, enzimas, lactose e substâncias minerais. A Tabela 1 mostra a composição média do leite de vaca¹.

Tabela 1: Composição média do leite de vaca¹.

Constituinte	Teor / g Kg ⁻¹	Variação / g Kg ⁻¹
Água	873	855 – 887
Lactose	46	38 – 53
Gordura	39	24 – 55
Proteínas	32,5	23 – 44
Substâncias minerais	6,5	5,3 – 8,0
Ácidos orgânicos	1,8	1,3 – 2,2
Outros	1,4	--

A água é o constituinte no qual estão dissolvidos, dispersos ou emulsionados os demais componentes.

A gordura ocorre no leite como pequenos glóbulos contendo principalmente triacilgliceróis, envolvidos por uma membrana lipoprotéica. O leite de vaca possui aproximadamente 440 ésteres de ácidos graxos e os principais são o ácido palmítico e o ácido oléico. A gordura é o constituinte que mais sofre variações (Tabela 1) em razão de alimentação, raça, estação do ano e período de lactação¹.

Todas as vitaminas conhecidas estão no leite. As vitaminas A, D, E e K estão associadas aos glóbulos de gordura e as demais são encontradas na fase aquosa. A concentração das vitaminas lipossolúveis depende da alimentação do gado, exceto a da vitamina K. Esta, como as vitaminas hidrossolúveis, é sintetizada no sistema digestivo dos ruminantes¹.

No leite, 95% dos compostos nitrogenados ocorrem como proteínas. O nitrogênio protéico do leite é constituído de cerca de 80 % de nitrogênio caseínico e de 20 % de nitrogênio não-caseínico (albuminas e globulinas). Diversos fatores influenciam na composição e na distribuição das frações nitrogenadas do leite bovino, tais como temperatura ambiente, doenças do animal, estágio de lactação, número de parições, raça, alimentação e teor energético da alimentação¹.

Numerosas enzimas podem ser encontradas no leite, como lipases, proteinases, óxido-redutases, fosfatases, catalase e peroxidase. O desenvolvimento, intencional ou não, de microrganismos no leite contribui para a grande ocorrência de enzimas. A atividade dessas enzimas é influenciada pelas condições do meio (temperatura, pH, acesso ao substrato), sendo alteráveis pelo processamento tecnológico¹.

A lactose é o glicídio característico do leite, formado a partir da glicose e da galactose, sendo o constituinte sólido predominante e menos variável (Tabela 1)¹.

O leite contém teores consideráveis de cloro, fósforo, potássio, sódio, cálcio e magnésio e baixos teores de ferro, alumínio, bromo, zinco e manganês, formando sais orgânicos e inorgânicos. A associação entre os sais e as proteínas do leite é um fator determinante para a estabilidade das caseínas perante diferentes agentes desnaturantes. O fosfato de cálcio, particularmente, faz parte da estrutura das micelas de caseína¹.

1.2. Qualidade do leite e legislação

No ano de 2010 o Brasil alcançou a quinta posição (Tabela 2) entre os principais países produtores de leite no mundo, atingindo a marca de 29.480.000 toneladas. Apesar da posição de destaque internacional, indicadores de produtividade voltados à pecuária bovina indicam que a qualidade do leite é uma das maiores preocupações relacionadas à produção no país, sendo necessárias mudanças significativas para que seja atingido um perfil de negócio competitivo e sustentável^{2,3}.

Tabela 2: Principais produtores de leite de vaca no mundo.

Produção de Leite – Países Selecionados									
Produção de Leite Fluido em Mil Toneladas									
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011 (p1)
União Européia	135.069	133.969	134.672	132.206	132.604	133.848	133.700	135.200	134.700
Estados Unidos	77.289	77.488	80.255	82.455	84.211	86.174	85.874	87.450	88.690
Índia	36.500	37.500	37.520	41.000	42.890	44.500	48.160	50.300	52.500
Rússia	33.000	32.000	32.000	31.100	32.200	32.500	32.600	31.740	31.400
Brasil	22.860	23.317	24.250	25.230	26.750	27.820	28.795	29.480	30.846
China	17.463	22.606	27.534	31.934	35.252	34.300	28.445	29.100	30.500
Nova Zelândia	14.346	15.000	14.500	15.200	15.640	15.141	17.397	16.897	18.642
México	9.784	9.874	10.164	10.051	10.657	10.907	10.866	11.176	11.330
Ucrânia	13.400	13.787	13.423	12.890	11.997	11.524	11.370	10.950	10.570
Argentina	7.950	9.250	9.500	10.200	9.550	10.010	10.350	10.600	11.070
Austrália	10.636	10.377	10.429	10.395	9.870	9.500	9.326	9.400	9.700
Canadá	7.734	7.905	7.806	8.041	8.212	8.270	8.280	8.350	8.350
Japão	8.400	8.329	8.285	8.137	8.007	7.982	7.910	7.790	7.800

Fonte: USDA (United States Department of Agriculture) - Dairy: World Markets and Trade/ December 2010.
(p1) Projeção.

No decorrer dos anos foram criadas diversas medidas para preservar a qualidade do leite, como o RIISPOA de 1981 que proíbe a adição de adulterantes químicos no leite destinado à alimentação humana; IN 51 do MAPA publicada em 2002 para o estabelecimento de padrões de qualidade para produtos lácteos processados no Brasil; o PAMvet, criado em 2003 pela ANVISA, para controlar resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos; e o PNQL, implementado em 2007 para que a população possa consumir produtos lácteos mais nutritivos, saborosos, seguros e também para favorecer situações em que o rendimento dos produtores seja aumentado³.

Os parâmetros determinados pelo MAPA para que o leite seja considerado de boa qualidade são: CBT (contagem bacteriana total); CCS (contagem de células somáticas); teores de gordura, lactose, proteína, sólidos totais, sólidos desengordurados; e pesquisa de resíduos de antibióticos.

Dentre os parâmetros supracitados, a alta CCS pode ser um indicador de que a vaca esteja com uma doença conhecida como Mastite ou Mamite. A doença é caracterizada por um processo inflamatório da glândula mamária, causada principalmente por bactérias e fungos, podendo também ser decorrente de problemas traumáticos, metabólicos, fisiológicos e alérgicos.

1.3. Mastite

A Mastite pode manifestar-se de duas diferentes formas: a clínica e a subclínica. No caso da Mastite clínica, o úbere da vaca apresenta-se inchado, avermelhado e quente. A composição do leite é alterada, com a presença de grumos, pus e sangue. Quando a vaca está com a Mastite subclínica, o leite e o úbere não apresentam alterações visíveis, sendo necessário realizar a análise do leite para detectá-la^{4,5}.

Para o tratamento da Mastite são usados medicamentos antimicrobianos (antibióticos) o que implica em um importante fator a ser controlado para a produção de leite com qualidade^{4,5}.

1.4. Antibióticos no leite

Quando se aplica um medicamento antibiótico em uma vaca, o leite por esta produzido passa a conter resíduos do medicamento durante um determinado tempo. Enquanto existir resíduos de antibiótico no leite, este não deve ser aproveitado ou comercializado^{6,7}.

A presença dos resíduos de antibióticos no leite tem sido um dos maiores desafios para os órgãos responsáveis pela saúde pública e para a indústria de alimentos. Quando presentes no leite, os antibióticos representam risco à saúde do consumidor. Esses riscos são representados por reações alérgicas, frequentemente associadas aos antibióticos β -lactâmicos; ação carcinogênica, associada ao cloranfenicol, à sulfametazina e aos nitrofuranos; a seleção de bactérias resistentes da flora normal, e possivelmente a transferência dessa resistência a outras bactérias susceptíveis^{8,9}.

Na indústria de laticínios, a presença de antibióticos no leite traz dificuldades técnicas, interferindo nos atributos organolépticos e tecnológicos dos produtos lácteos industrializados, principalmente no processamento do iogurte, manteiga e queijo, devido à inibição da flora bacteriana⁶.

Os processos térmicos empregados para o beneficiamento de leite no Brasil são: pasteurização e processo longa vida. A pasteurização consiste no tratamento térmico a 75 °C durante 15 a 20 segundos, enquanto que o processo longa vida é feito através do tratamento térmico de 130 °C a 150 °C durante 3 a 5 segundos. Ambos os processos não destroem os resíduos de antibióticos no leite, constituindo

risco para o consumidor e problema para a indústria. Para eliminar a penicilina do leite é necessário atingir 100 °C durante três horas, ocorrendo o mesmo com a tetraciclina⁷.

A presença desses resíduos no leite ocasiona uma série de problemas, entre eles o da fermentação, já que as bactérias lácticas são as mais sensíveis a antibióticos. O fermento láctico contém duas bactérias sensíveis aos antibióticos, *Streptococcus cremoris* e *Lactobacillus bulgaricus*. Elas causam acidificação e coagulação do leite, mas se a amostra contiver antibiótico, seu desenvolvimento será inibido e a coagulação não ocorrerá, interferindo na elaboração de diversos produtos lácteos, como queijo, iogurte e manteiga⁸.

Visando a segurança dos alimentos, a presença de antibióticos além de interferir na qualidade dos produtos beneficiados também é encarada como um perigo à ser controlado, logo que em humanos, o cloranfenicol pode causar efeitos colaterais adversos, anemia aplásica e hipoplásica, granulocitopenias, devido à sua ação sobre células da medula óssea e reatividade fotossensível, após o uso de níveis terapêuticos ou profiláticos. A ligação da tetraciclina ao cálcio pode resultar na inibição do desenvolvimento dos dentes e do crescimento ósseo. Os dentes podem tornar-se descolorados e sabe-se que ocorre hipoplasia dos dentes decíduos permanentes⁶.

1.4.1. ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

Um dos grandes avanços da quimioterapia moderna foi a introdução da benzilpenicilina em ensaios clínicos cerca de 60 anos atrás. O sucesso das penicilinas e seus compostos relacionados (antibióticos β -latâmicos ou β -lactamas) como os agentes antimicrobianos mais amplamente utilizados, repousa sobre a alta eficiência e especificidade que estes apresentam¹⁰.

No entanto, a eficiência dessas drogas quimioterápicas foi desafiada pela emergência de cepas de patógenos que apresentam resistência à ação antimicrobiana alcançada. Em consequência a este fato, novas moléculas têm sido progressivamente desenvolvidas, possuindo estruturas cada vez mais diferentes das drogas originais. Assim, os antibióticos β -lactâmicos enquadram-se em uma família de compostos em constante expansão tendo como recurso em comum o anel β -lactâmico de quatro membros (Figura 1)¹⁰.

Os antibióticos β -lactâmicos interferem de maneira específica na síntese do peptidoglicano, sendo este o componente principal da parede celular de bactérias, formando uma rede tridimensional que as circundam com a finalidade de protegê-las de sua própria pressão osmótica. O peptidoglicano é também um elemento essencial para a manutenção da célula e rigidez da parede celular em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Essa macromolécula é exclusiva no universo das bactérias, o que explica a capacidade dos antibióticos em interferir na biossíntese, devido a alta especificidade que possuem^{10,11}.

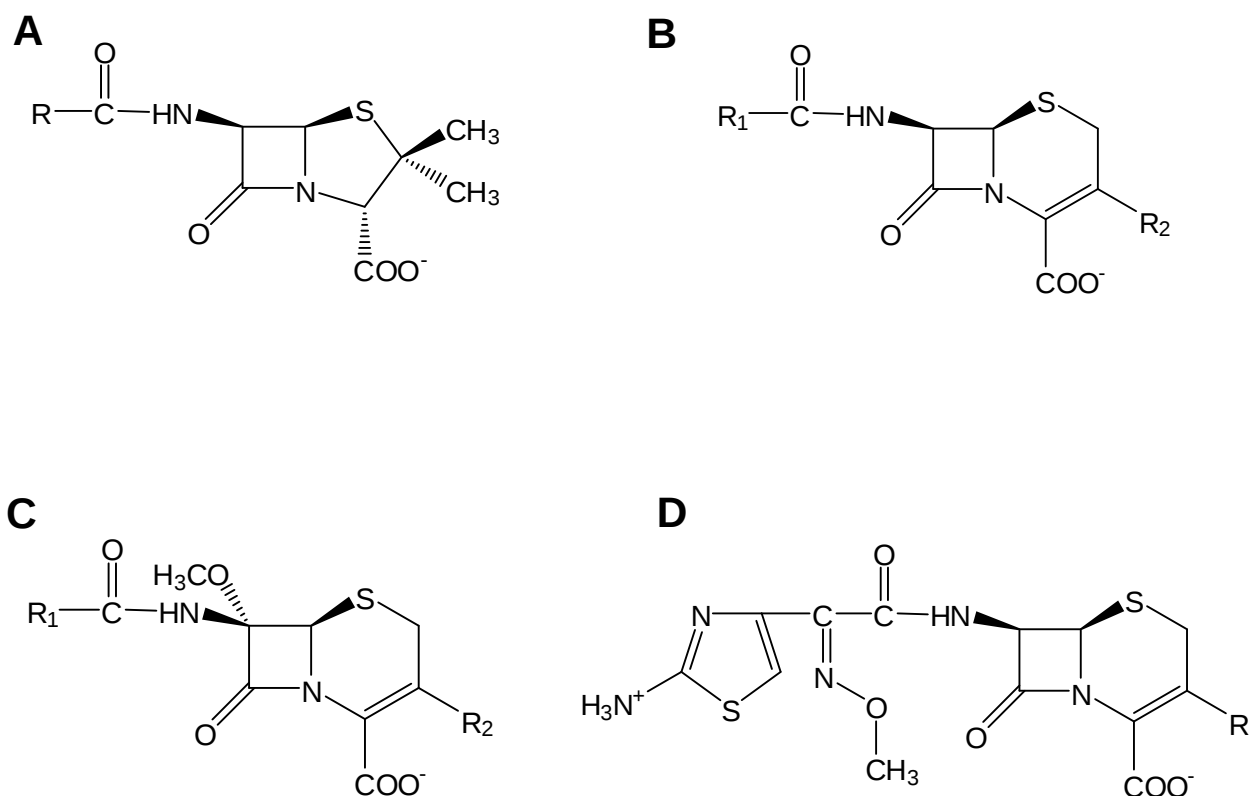


Figura 1: Estrutura genérica de alguns antibióticos β -lactâmicos. (A) Penicilinas (exemplo: benzilpenicilina, ampicilina, amoxilina), (B) Cefalosporinas, (C) Cefamicinas (exemplo: cefoxitina), (D) Cefotaxima (oximino, cefalosporinas).

As penicilinas, são os antibióticos β -lactâmicos mais administrados às vacas de leite. Considerando a alta porcentagem de pessoas alérgicas à penicilina e seu amplo uso em fazendas produtoras de leite, os resíduos de penicilina constituem a maior preocupação com relação aos riscos oferecidos aos humanos⁶. Por este motivo a benzilpenicilina, conhecida como penicilina G (Figura 2) foi selecionada como analito de interesse para o desenvolvimento do biossensor.

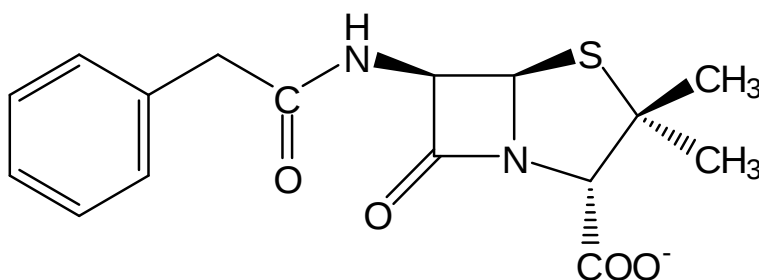


Figura 2: Estrutura da benzilpenicilina (Penicilina G).

1.5. β -LACTAMASES

As β -lactamases são enzimas extracelulares ou periplasmáticas produzidas por bactérias que possuem resistência à antibióticos β -lactâmicos. As enzimas são divididas em 4 classes baseadas em sua estrutura primária e mecanismos catalíticos.

Enzimas das classes A,C e D possuem sítio-ativo serina, cujo ciclo catalítico baseia-se no ataque ao anel β -lactâmico da Penicilina G formando o ácido penicilinoico, segundo a sequencia de reações mostrada na Figura 3, e não podem ser diferenciadas por suas estruturas primárias^{10,11}.

As β -lactamases da classe B são conhecidas como metalo-proteínas que possuem um íon metálico bivalente necessário à atividade catalítica, geralmente esse íon é o Zn^{2+} . Essas enzimas são produzidas pelo *Bacillus Cereus* (β -lactamase II) que também produz duas enzimas distintas da classe A; pelas *Pseudomonas maltophilia* que também produz enzimas da classe C; e pelas *Aeromonas hydrophila* e pelos *Bacteroides fragilis*¹².

As β -lactamases inativam os antimicrobianos β -lactâmicos através da hidrólise da ligação C-N do anel β -lactâmico. Este mecanismo de hidrólise difere entre as serina- β -lactamases (classes A,C e D) e as metalo- β -lactamases da classe B.

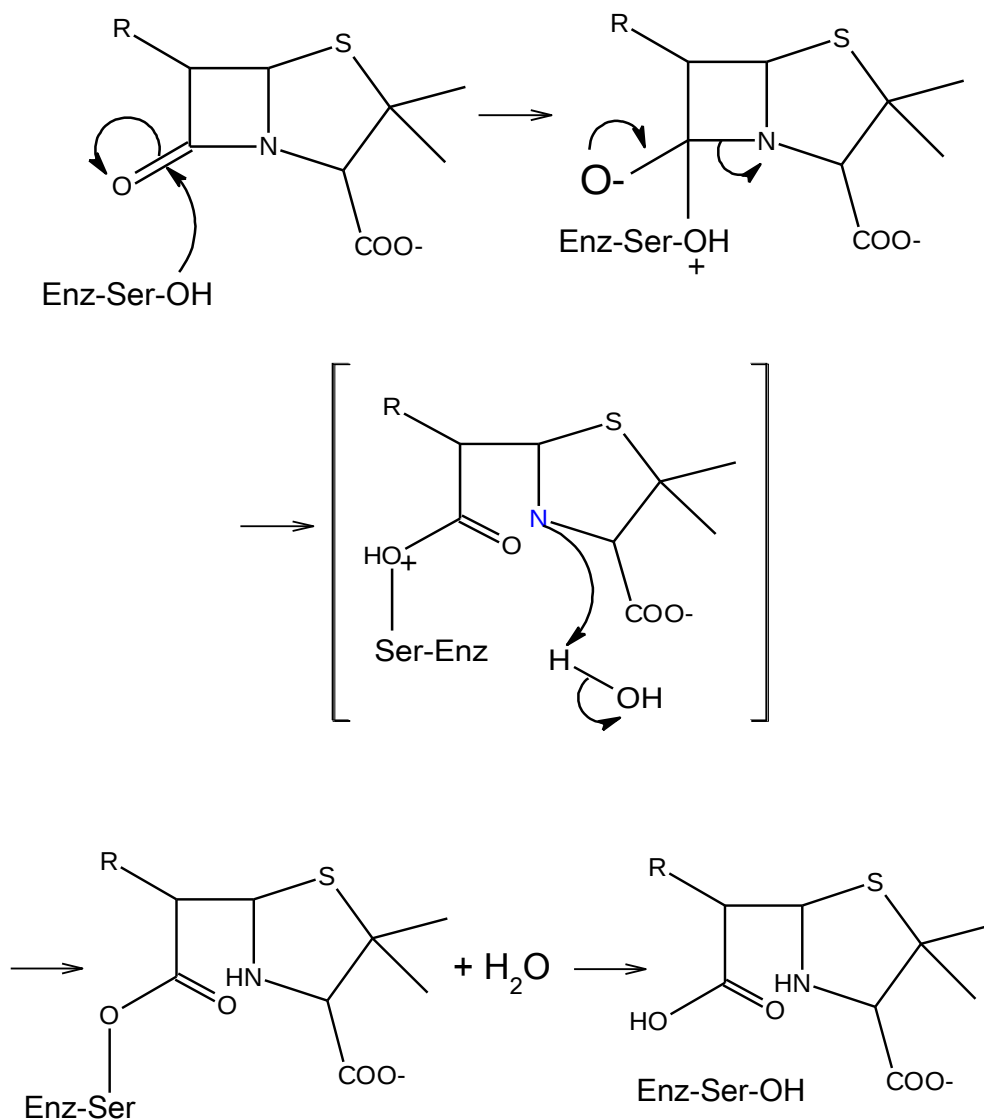


Figura 3: Mecanismo de ação de β -lactamases das classes A,C e D sobre uma penicilina.

As β -lactamases de classe B possuem diferentes aminoácidos que definem a estrutura do seu sítio ativo o qual é coordenado por pelo menos 1 ou 2 íons zinco, estes, por sua vez, se coordenam a duas moléculas de água que servem como nucleófilos e hidrolisam a ligação amida do anel β -lactâmico. A sequência HXHXD (histidina-X-histidina-X-ácido aspártico) facilita a coordenação dos íons zinco no sítio ativo.

O mecanismo de hidrólise das β -lactamases de classe B é complexo e varia de uma enzima para outra, por este motivo ele não está completamente esclarecido apesar da elucidação da estrutura tridimensional de algumas β -lactamases de classe B.

O mecanismo mostrado na Figura 4 sugere que o sítio ativo orienta e polariza o anel β -lactâmico para facilitar o ataque nucleofílico pela ligação do íon zinco a água e/ou hidroxila.

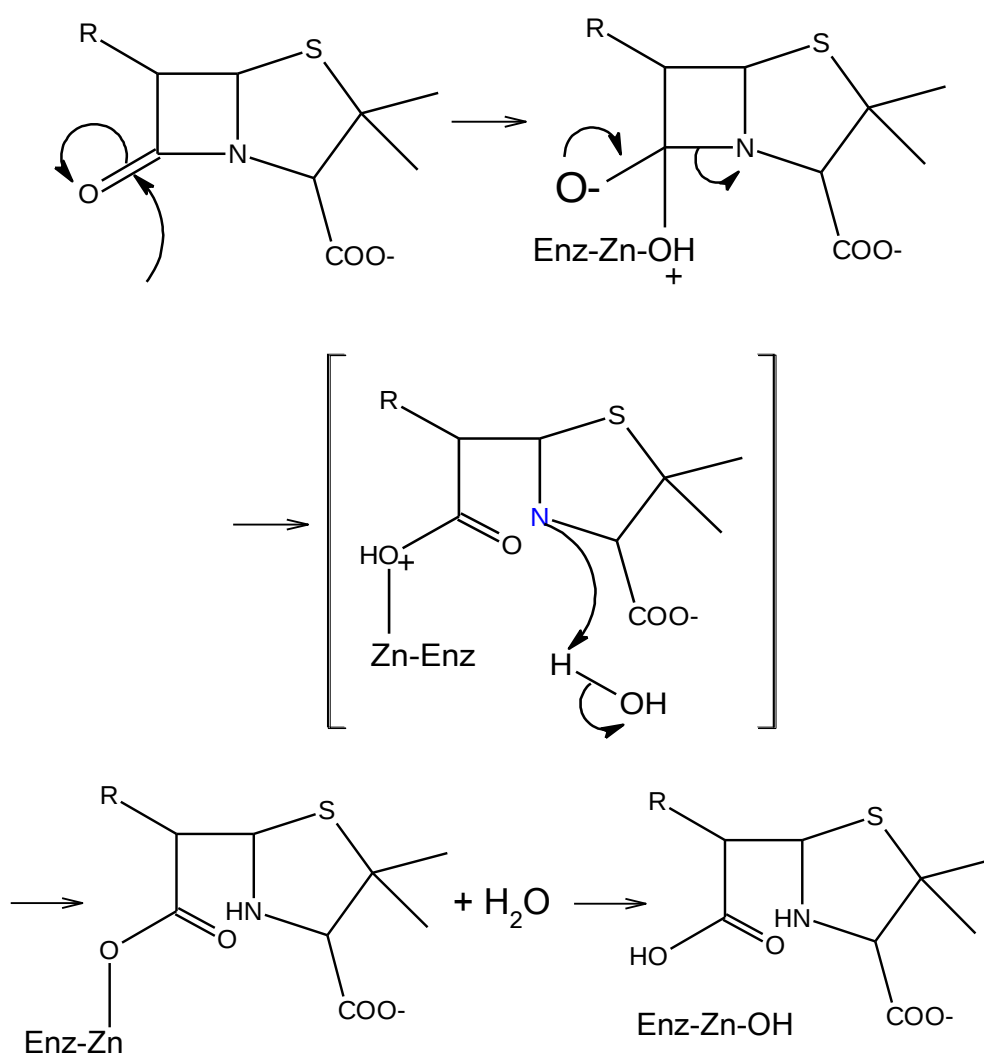


Figura 4: Mecanismo de ação das β -lactamases de classe B sobre uma penicilina.

As β -lactamases de classe B (Figura 5) possuem um sítio ativo de amplo encaixe que pode acomodar diferentes substratos β -lactâmicos, o que facilita muito seu espectro de atividade¹². Para o presente trabalho foi usada a β -lactamase de classe B oriunda de *Bacillus cereus*.

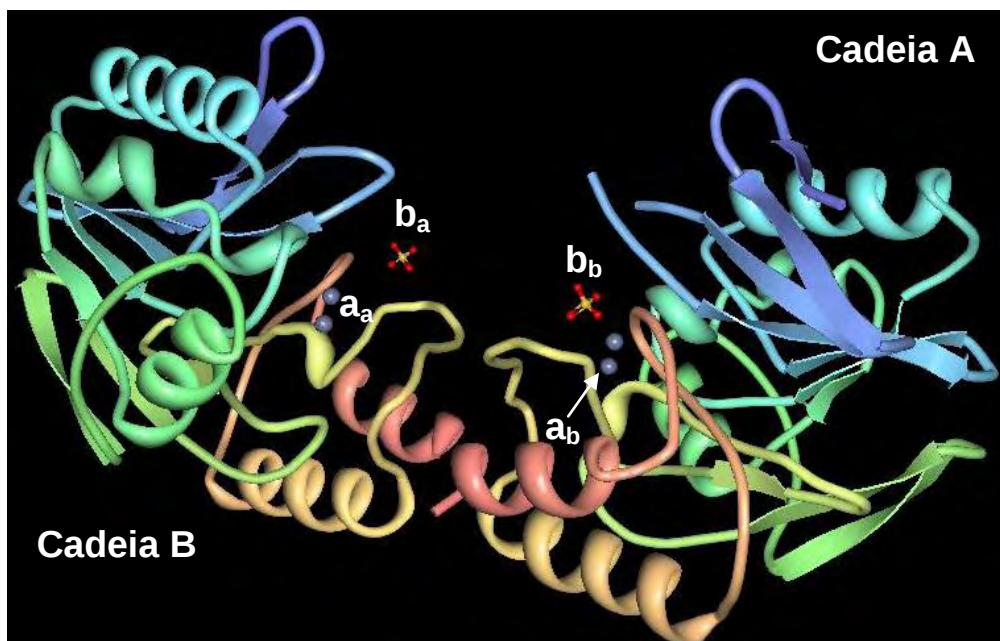


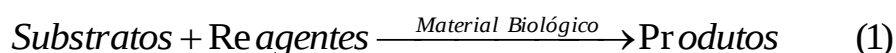
Figura 5: Visualização do sítio ativo binuclear da β -lactamase dependente de zinco ou β -lactamase – Classe B, sintetizada pelo *Bacillus cereus*. Destacando os átomos de Zn (a_a e a_b) e os resíduos de SO_4^{2-} (b_a e b_b) que fazem parte das duas cadeias A e B que constituem o sítio ativo binuclear da enzima. Disponível em: <http://www.pdb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1BC2&bionumber=1>.

1.6. Biossensores

Um biossensor é um dispositivo sensor que utiliza material biológico, como elemento de reconhecimento, intimamente ligado a um transdutor, o qual converte o sinal biológico em um sinal mensurável. O material biológico pode ser uma enzima, anticorpo, antígeno, microorganismos, tecido animal ou vegetal, células, organelas, etc.

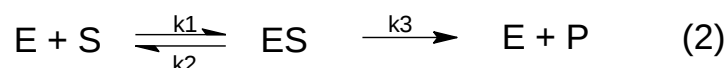
Em biossensores o material biológico é imobilizado em um meio adequado, podendo este ser uma membrana por exemplo, que é acoplada na superfície do transdutor, o qual monitorará alguma mudança física (corrente, potencial, mudança de cor, etc.) decorrente da formação de algum produto ou consumo de reagentes, como consequência da reação bioquímica entre o material biológico e seu correspondente substrato^{13,14}.

No caso particular de dispositivos enzimáticos, ao imergir um biossensor em solução contendo o substrato, este se difunde para o interior do meio onde se encontra a enzima imobilizada, que catalisa a reação, formando assim os produtos ou consumindo cosubstratos (reagentes), tal como esquematizado na reação 1¹³.



As enzimas são proteínas que catalisam as reações biológicas com grande eficiência. O uso crescente destes catalisadores em análises químicas ocorre em função da alta sensibilidade e especificidade das suas reações químicas, sendo que a especificidade pode variar em função de uma particular enzima¹⁴.

As reações enzimáticas que envolvem um único substrato são representadas pela expressão geral (reação 2):



onde E representa a enzima, S o substrato, ES o complexo intermediário enzima-substrato e P o produto formado.

Para uma concentração fixa de enzima a velocidade da reação da catálise enzimática é dada pela equação de Michaelis-Menten (equação 1):

$$V = \frac{V_M [S]}{K_{MM} + [S]} \quad (1)$$

Onde: V representa a velocidade de reação, V_M a velocidade máxima e equivale ao valor de $k_3[S]$, $[S]$ a concentração inicial do substrato e, $K_{MM} = (k_2 + k_3 / k_1)$ a constante de Michaelis-Menten derivada das constantes apresentadas na reação 2.

A velocidade de reação (em unidades de V_M) varia em função da concentração de substrato, $[S]$. A velocidade de reação aumenta com o aumento da concentração de substrato até atingir valor máximo onde o valor da concentração do substrato não mais afeta a velocidade da reação (V_R), (Figura 6).

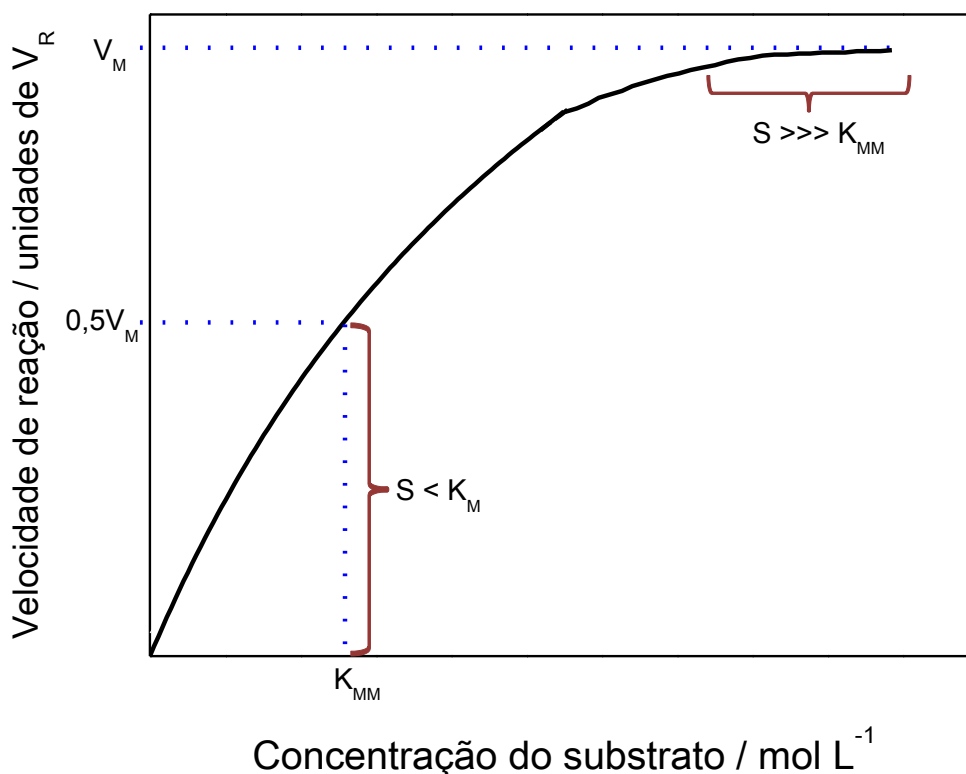


Figura 6: Dependência da velocidade de reação (em unidades de V_R) com a concentração do substrato $[S]$. V_M é a velocidade máxima e K_{MM} é a constante de Michaelis – Menten.

Nos métodos enzimáticos de análise, a enzima é utilizada para converter uma substância a ser estudada (substrato), a qual não é diretamente medida, em outra a qual pode ser medida ou monitorada por alguma técnica analítica, como: manometria, espectrofotometria, fluorescência, eletroquímica e outras. Alternativamente, a diminuição da concentração de um outro reagente pode ser diretamente monitorada. Para a determinação analítica de um substrato a reação enzimática deve ser de primeira ou pseudo-primeira ordem com respeito ao substrato de interesse, ou seja $[S] < K_{MM}$ (região linear do gráfico apresentado na Figura 6). No gráfico, a região onde $[S] \gg K_{MM}$ é utilizada para se determinar a atividade das enzimas, cuja reação é de ordem primeira ou pseudo-primeira ordem em relação à enzima e de ordem zero em relação ao substrato¹⁴.

O gráfico de velocidade face a $[S]$ mostrado anteriormente na Figura 6, não é linear e na realidade é hiperbólico. Embora a baixas concentrações de substrato se mantenha linear, vai curvando à medida que aumenta a concentração de substrato. Antes da chegada dos programas computacionais, que atualmente permitem ajustar regressões não lineares de forma simples, podia chegar a ser realmente difícil estimar os valores de K_{MM} e V_M nos gráficos não lineares. Isto deu lugar a que vários investigadores concentrassem os seus esforços em desenvolver métodos de linearização da equação de Michaelis-Menten, dando como resultado o gráfico de Lineweaver-Burke, o diagrama de Eadie-Hofstee e o gráfico de Hanes-Woolf.

O gráfico de Lineweaver-Burk ou representação de duplo recíproco é a forma mais comum e simples, de mostrar os dados cinéticos. Para tal, tomam-se os valores inversos de ambos os lados da equação de Michaelis-Menten, tendo como resultado uma linha reta cuja equação é $y = bx + a$ (equação 2), sendo o ponto de interseção entre a reta e o eixo das ordenadas equivalente a $1/V_M$, e o ponto de interseção entre a reta e o eixo de abcissas equivalente a $-1/K_{MM}$.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_{MM}}{V_M} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_M} \quad (2)$$

Evidentemente não se podem tomar valores negativos para $1/[S]$; o mínimo valor possível é $1/[S] = 0$, que corresponderia a uma concentração infinita de substrato, e daí $1/V = 1/V_M$. O valor do ponto de intercepção entre a reta e o eixo x é uma extrapolação de dados experimentais obtidos em laboratório.

1.6.1. TIPOS DE BIOSSENSORES

A construção de biossensores deve ser feita através do uso de um material biológico e um transdutor, que sejam adequados às propriedades da amostra de interesse e do tipo de grandeza física que será medida pelo transdutor. Para um mesmo analito (substrato), é possível ter a opção de vários materiais biológicos, para um mesmo transdutor ou *vice-versa*.

A Figura 7 mostra um esquema genérico de biossensor, e as possíveis combinações existentes de substratos, material biológico e transdutores.

Biossensores podem ser classificados pelo tipo de material biológico ou pelo sistema de transdução. No primeiro caso, são classificados em biossensores enzimáticos, aqueles que usam enzimas como material de reconhecimento do analito; imunossensores, aqueles que usam anticorpos ou antígenos como material biológico; genossensores, aqueles que usam ácidos nucleicos, como RNA ou DNA^{14,15}.

Segundo o tipo de transdução os biossensores podem ser classificados em eletroquímicos, ópticos, piezelétricos e calorimétricos. Dentre eles os biossensores com

transdução eletroquímica são os mais comuns, mostrando uma subdivisão em amperométricos, potenciométricos, condutométricos, etc.

Biossensores enzimáticos com transdução amperométrica são bastante populares, principalmente por apresentarem várias características vantajosas em relação aos outros tipos de biossensores. Dentre elas podem-se mencionar, a fácil preparação, alta seletividade e possibilidade de monitoramento em tempo real e de forma econômica. Estes tipos de biossensores se baseiam principalmente na geração ou consumo de elétrons durante a catálise de substratos por enzimas óxido-redutases.

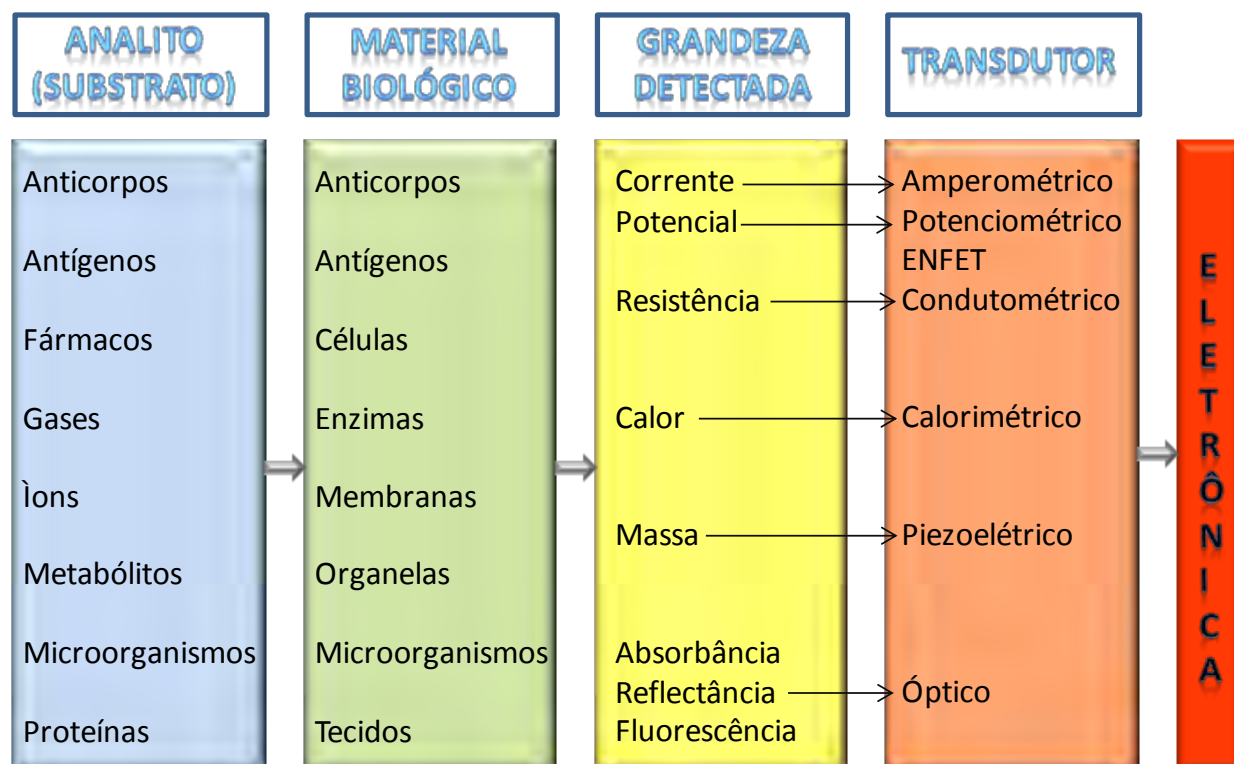


Figura 7: Esquema genérico dos biossensores mais utilizados.

1.6.2. (BIOS)SENSORES AMPEROMÉTRICOS

Os (bios)sensores amperométricos são dispositivos que ao serem mantidos em um potencial fixo fornecem sinais de corrente faradaica proporcional à concentração do analito, em função de processos eletródicos que ocorrem na interface eletrodo/solução. Entretanto a corrente medida em experimentos eletroquímicos também possui um componente capacitivo, associado a mudanças da capacitância da dupla camada elétrica durante variações de potencial.

No caso de (bios)sensores amperométricos o potencial é mantido constante durante a medição da corrente, sendo portanto importante a avaliação da seletividade das determinações uma vez que, via de regra, em amostras complexas podem existir espécies químicas que também são eletroativas no potencial selecionado^{13,16}. Para solucionar os problemas de seletividade considerados acima é adotada como estratégia a modificação da superfície do eletrodo, com compostos biológicos altamente seletivos¹⁵.

1.7. Modificação de eletrodos na construção de biossensores enzimáticos

Um aspecto importante para a construção de um biossensor amperométrico, que não é nada mais do que um eletrodo quimicamente modificado, é a escolha do material eletródico base. O material selecionado deve apresentar características eletroquímicas apropriadas ao método de imobilização selecionado. No caso dos biossensores enzimáticos de segunda geração a imobilização de um mediador de elétrons na superfície do eletrodo ocorre comumente com a utilização de enzimas^{17,18}.

O uso da pasta de carbono para a identificação de um analito oferece a viabilidade de uso de um material insolúvel em solução, situação na qual a lixiviação do modificador desde a superfície do eletrodo até a célula de medida é evitada.

Os eletrodos a base de carbono apresentam grupos funcionais contendo oxigênio, tais como ácidos carboxílicos, álcoois, fenóis, anidridos e cetonas cujas as concentrações podem variar conforme a reação de oxigenação de átomos de carbono presentes no material do eletrodo, estes são passíveis de modificação¹³.

As técnicas de imobilização proporcionam a reutilização da enzima, aumentam a estabilidade, reduzem custos e em alguns casos, aumentam a atividade enzimática¹⁰. Existem muitos métodos de imobilização relatados na literatura^{17,18,19}, neste trabalho é dado destaque aos métodos de imobilização por ligação covalente e ligação covalente cruzada, que são aquelas que foram avaliadas para a construção dos biossensores propostos.

1.7.1. LIGAÇÃO COVALENTE

Neste tipo de imobilização ocorre a ligação covalente de grupos funcionais não ativos da enzima (não essenciais para a atividade catalítica) a grupos reativos (hidroxila, carbonila, amino, fenólico, imidazólico, tiol) ligados na superfície sólida do suporte insolúvel. Um simples contato de uma solução de enzima com o suporte pré-ativado é suficiente para imobilizar o material biológico por vários meses, sob refrigeração de 8 °C, sem perda significativa de sua atividade catalítica¹³. O emprego do método de ligação covalente para o preparo de biossensores pode levar a uma melhor estabilidade operacional, uma vez que a enzima é ligada irreversivelmente à matriz^{13,16}.

1.7.2. LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA

O método baseia-se na formação de partículas macroscópicas em decorrência da formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzima e/ou as moléculas de suporte inerte com reagentes funcionais. Reagentes bifuncionais (homofuncionais ou heterofuncionais) são utilizados com grande frequência na imobilização de enzimas e/ou outras proteínas.

Os reagentes homofuncionais utilizados são: glutaraldeído e diazobenzidina; enquanto que os heterofuncionais incluem a diazobenzidina-3,3'-dianisidina, *N,N'*-hexametenobisiodoacetamida, entre outros (Figura 8).

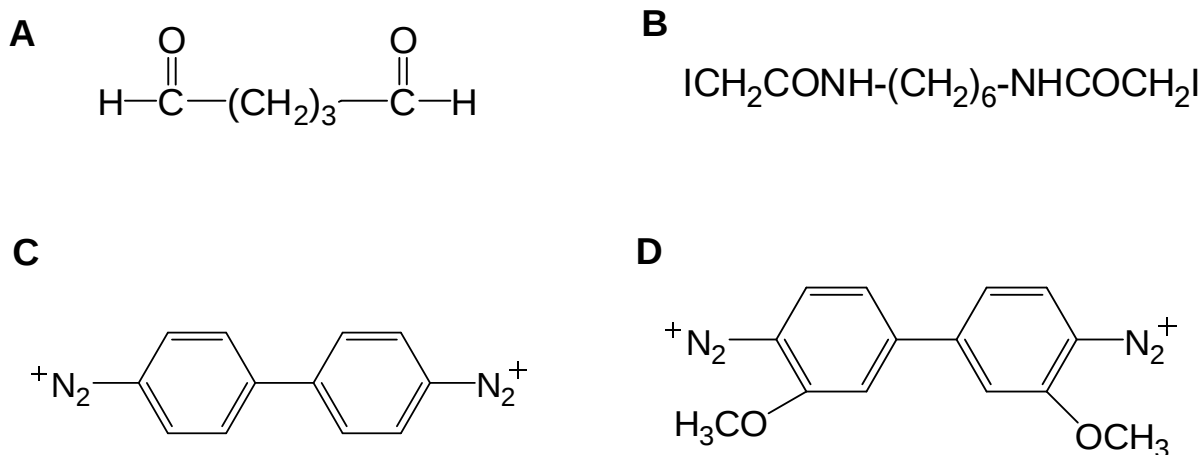


Figura 8: Estrutura química de alguns reagentes multifuncionais usados na imobilização de enzimas em suportes sólidos. (A) glutaraldeído; (B) *N,N'*-hexametenobisiodoacetamida; (C) diazobenzidina e (D) diazobenzidina-3,3'-dianisidina.

O método de imobilização com o glutaraldeído é um dos mais empregados, pois a enzima geralmente é mantida em um ambiente semelhante ao encontrado na natureza, conferindo-lhe boa estabilidade frente as variações de pH, força iônica,

solventes e temperatura^{13,16}, mantendo ou modificando muito pouco a atividade enzimática.

1.8. Mediadores de elétrons

Biossensores que usam mediadores de elétrons em sua composição são classificados como sendo de segunda geração. O emprego de mediadores para a construção de biossensores amperométricos permite que estes sejam operados em um potencial menor em relação ao requerido sem a presença de mediador e com reversibilidade em relação ao estado de oxidação, reduzindo a possibilidade de interferências nas análises.

Os mediadores de elétrons são substâncias eletroativas que sofrem reações de óxido-redução facilitando a transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo, como por exemplo: ferroceno, TCNQ e ftalocianina de cobalto.

Um grande interesse tem sido dado na construção e emprego destes eletrodos, principalmente, devido à facilidade e evolução das técnicas de imobilização de mediadores e enzimas.

Os mediadores têm sido incorporados aos eletrodos por adsorção, oclusão em filme polimérico, por ligação covalente ou ocluídos em pasta de carbono²⁰. No presente trabalho é dado destaque ao mediador ftalocianina de cobalto (CoPc), que permitiu o desenvolvimento satisfatório desta pesquisa.

1.8.1. FTALOCIANINA DE COBALTO

A CoPc (Figura 9) é conhecida há muito tempo como catalisador homogêneo e heterogêneo para uma grande variedade de reações químicas. Ela funciona como catalisador redox no qual o estado de oxidação do centro metálico varia durante o ciclo catalítico²¹⁻²³.

Como mediador de elétrons em 2+biossensores, seu uso é pouco explorado, entretanto este composto é um ótimo candidato para tal função, devido a suas propriedades para a aplicação em sensores e biossensores. Contudo, é muito importante verificar, se na presença do substrato enzimático a resposta obtida é devida à reação bioquímica ou simplesmente à presença deste complexo.

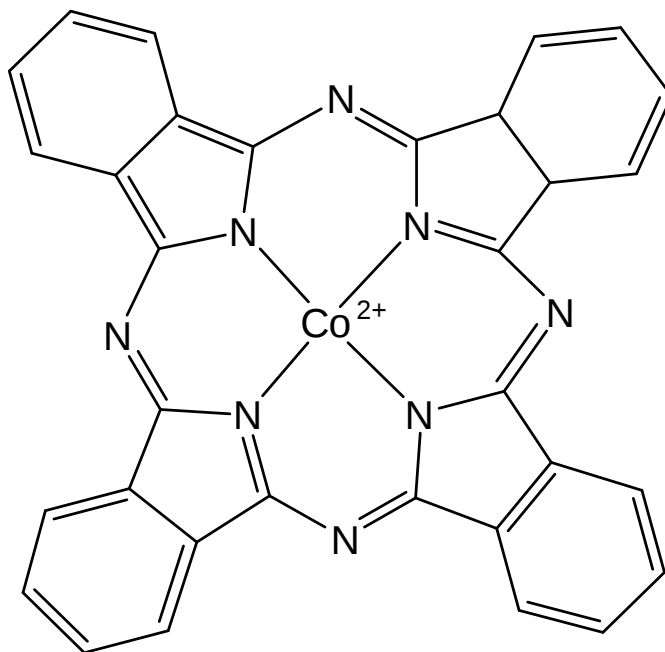


Figura 9: Estrutura da Ftalocianina de Cobalto (CoPc).

1.9. Iniciativa para o desenvolvimento do trabalho

A iniciativa para o desenvolvimento deste trabalho foi tomada, mediante o conhecimento do controle que é feito para a detecção de resíduos de antibióticos β -lactâmicos no leite de vaca cru, captado por uma indústria de laticínios, localizada na cidade de Araraquara – SP e a pretensão pelo desenvolvimento de um método alternativo com tempo de duração menor que o do controle atualmente realizado, que emprega o kit analítico, Copan Milk Test (CMT), reconhecido e com uso autorizado pelo MAPA²⁴.

O CMT é fornecido em tubos individuais preenchidos com um meio de Agar. O Agar é pré-semeado com esporos de *Bacillus stearothermophilus* e possui incorporado açúcar fermentável (glicose) e indicador de pH (azul de bromocresol). Conforme a Figura 10, o operador pipeta 100 μ L de leite sobre a superfície e, em seguida incuba o ensaio em bloco aquecedor (64 °C), por um período de 3 horas.

No decorrer do teste o leite difunde pelo meio Agar e se não houver antibiótico presente, ou se, a quantidade existente for inferior ao limite de detecção do kit, os esporos germinam, crescem e metabolizam o açúcar. O ácido produzido à partir da fermentação da glicose muda a cor do indicador de púrpura para amarelo.

Alternativamente, quando o antibiótico está presente no leite, ocorre a inibição da germinação e crescimento dos esporos, conseqüentemente não ocorre fermentação no meio e o indicador mantém a cor púrpura.

O CMT possui o limite de detecção de 1 – 2 μ g Kg⁻¹ para o sal sódico de Penicilina G, enquanto que o limite máximo recomendado pelo MAPA equivale a 4 μ g Kg⁻¹.

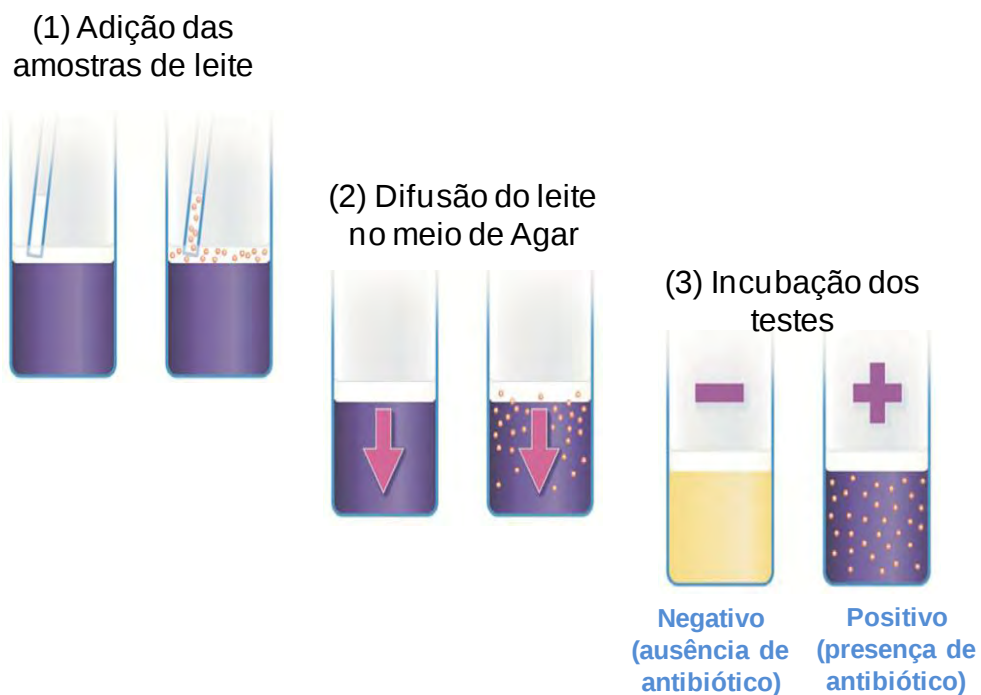


Figura 10: Etapas do ensaio utilizando o CMT. Tempo total do teste 3 horas.

Mediante a situação atual é proposto um método de detecção de antibióticos β -lactâmicos no leite de vaca cru, baseado na construção de um biossensor amperométrico de segunda geração, utilizando pasta de carbono modificada com enzima β -lactamase-classe B (β -lactamase) e um mediador de elétrons, como um método alternativo aos já existentes.

2. OBJETIVO

Este trabalho visa à construção e aplicação de um biossensor amperométrico à base de pasta de carbono modificada, contendo a enzima β -lactamase-B para a determinação de penicilina G em amostras de leite de vaca *in natura*.

2.1. Objetivos específicos

- 2.1.1. Otimização da preparação do biossensor: Escolha do mediador de elétrons e tipo de imobilização da enzima.
- 2.1.2. Otimização dos parâmetros de análise: potencial aplicado, solução tampão, pH e concentração do tampão .
- 2.1.3. Avaliação do biossensor na análise de leite cru, através de estudos de recuperação.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico, e todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a 25°C) obtida de um equipamento para purificação Milli-Q, Direct - 0,3

Foram utilizados no desenvolvimento do projeto β -lactamase de *Bacillus cereus*, ftalocianina de cobalto (CoPc), *bis*-ciclo-pentadienil-ferroceno (ferroceno), tetracianoquinodimetano (TCNQ), solução de glutaraldeído, soluções tampão PIPES, TRIS, HEPES, óleo mineral (Nujol[®]), grafite em pó (partícula $< 5 \mu\text{m}$) e met-*p*-toluenesulfonato de *N*-ciclohexil-*N'*-(2-morfolinoetil)carbodiimida (CDI) todos provenientes da Sigma-Aldrich[®]; o KH_2PO_4 , acetato de sódio, hidróxido de sódio, ferrocianeto de potássio, ferricianeto de potássio e álcool isopropílico foram da Synth[®].

O pH das soluções tampão foi ajustado utilizando um pH-metro da Thermo Scientific[®] (Orion 3 Star pH, Benchtop – USA), empregando um eletrodo de vidro combinado para realização das medidas.

3.2. Construção dos biossensores empregando a técnica de ligações covalentes cruzadas: Método I

Estudos iniciais foram realizados empregando a técnica de ligações covalentes cruzadas com a finalidade de preparar a pasta de carbono e imobilizar a enzima β -lactamase em um único passo, onde resíduos de aminoácidos não essenciais à atividade catalítica da enzima ligam-se a uma molécula orgânica homofuncional (glutaraldeído) fixando-a à estrutura de grafite (suporte).

Para isso 250 μL de β -lactamase (10 U), 30 mg de mediador de elétrons, 400 μL de glutaraldeído 2,5% (m/v), 1,0 mL de tampão Tris 0,1 mol L^{-1} (pH = 7,00) e 100 mg de grafite em pó foram misturados em um vidro de relógio através de uma bagueta de vidro por cerca de 15 minutos, quando não é mais observada a presença de grumos na mistura, que foi mantida durante 24 h sob refrigeração de 8 °C para a imobilização da enzima e secagem²⁷.

Em seguida cerca de 40 μL de óleo mineral foram adicionados ao material seco para a obtenção de consistência da pasta e preenchimento do eletrodo de trabalho tal como mostrado na Figura 11 (um tubo de vidro de 4 mm de diâmetro interno e 1 mm de profundidade), previamente limpo com álcool isopropílico.

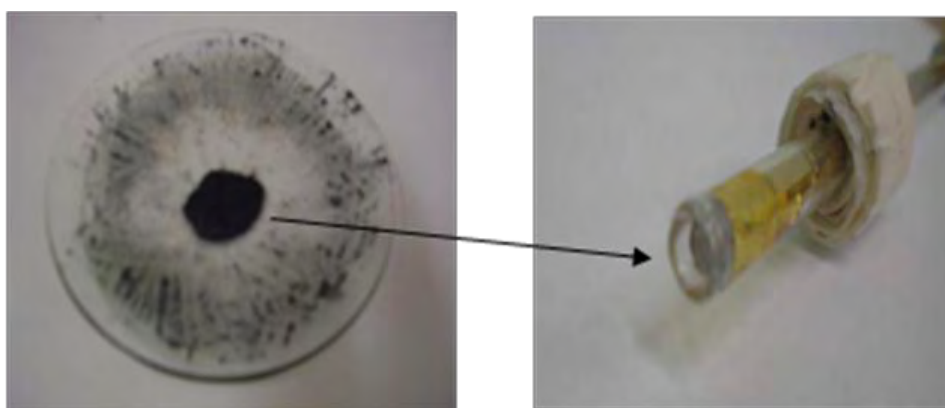


Figura 11: Pasta de carbono modificada e o correspondente eletrodo para a realização das medidas.

Foram avaliados os mediadores de elétrons; *bis*(ciclo-pentadienil)ferroceno (ferroceno) e ftalocianina de cobalto (CoPc), na construção dos biossensores.

Os eletrodos testados foram previamente condicionados em solução tampão fosfato pH 7,00, durante 20 minutos e em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

3.3. Construção dos biossensores empregando a técnica de ligações covalentes: Método II

Foi seguido o procedimento descrito por Sotomayor e colaboradores²⁵. Misturou-se 100 mg de pó de grafite com 1,1 mg de met-*p*-toluenesulfonato de *N*-ciclohexil-*N'*-(2-morfolinoetil)carbodiimida (CDI) e 300 μL de solução tampão acetato 0,05 mol L⁻¹ (pH 4,8) mantendo-se a mistura em agitador magnético durante 2 horas e 25 °C.

A seguir a mistura foi lavada com água destilada, com a finalidade de ser removido o excesso de solução tampão acetato, e mantida por 4 horas à temperatura ambiente dentro de uma capela para a secagem do grafite ativado.

A imobilização da enzima foi realizada pela mistura de 100 mg de grafite previamente ativado com CDI, 10 U de β -lactamase dissolvida em solução tampão fosfato (250 μL), 325 μL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e 7,5 mg de mediador de elétrons, feita até o desaparecimento de grumos, em um vidro de relógio e com o auxílio de uma bagueta .

A mistura foi deixada reagir por 16 horas a 4 °C, para permitir que a reação procedesse. Após este tempo foi obtido um material seco, pronto para ser misturado com 40 μL de óleo mineral para obtenção da pasta de carbono, a qual foi colocada na extremidade de um tubo de vidro de 4 mm de diâmetro interno e 1 mm de profundidade, previamente limpo com álcool isopropílico, para obter o respectivo biossensor.

Nesta parte do trabalho, foram avaliados os mediadores; *bis*(ciclopentadienil)ferroceno (ferroceno), tetracianoquinodimetano (TCNQ) e ftalocianina de cobalto (CoPc). Pastas de carbono contendo grafite funcionalizado com CDI sem enzima e sem mediador, também foram preparadas para efeitos de comparação.

Os eletrodos testados foram previamente condicionados em solução tampão fosfato pH 7,00, durante 20 minutos e em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

3.4. Medidas Eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um micro-potenciostato da Autolab[®], usando uma célula eletroquímica convencional de 03 eletrodos, preenchida com 10,0 mL de eletrólito (soluções tampão testadas), contendo um eletrodo de referência de Ag|AgCl, (KCl sat.), um fio de platina em forma de espiral como contra eletrodo e o(s) eletrodo(s) de pasta de carbono modificada como eletrodo(s) de trabalho (Figura 12).

Dentre as várias técnicas eletroanalíticas existentes, foi utilizada neste trabalho, a voltametria cíclica para caracterização dos sensores propostos, com $\nu = 20\text{mV.s}^{-1}$ e intervalo de potencial de -300 mV a 500 mV. E a amperometria para efetuar as análises quantitativas de Penicilina G com adições de 100 μL de analito em intervalos de 10 segundos entre uma adição e outra nos potenciais selecionados durante a otimização do biossensor.

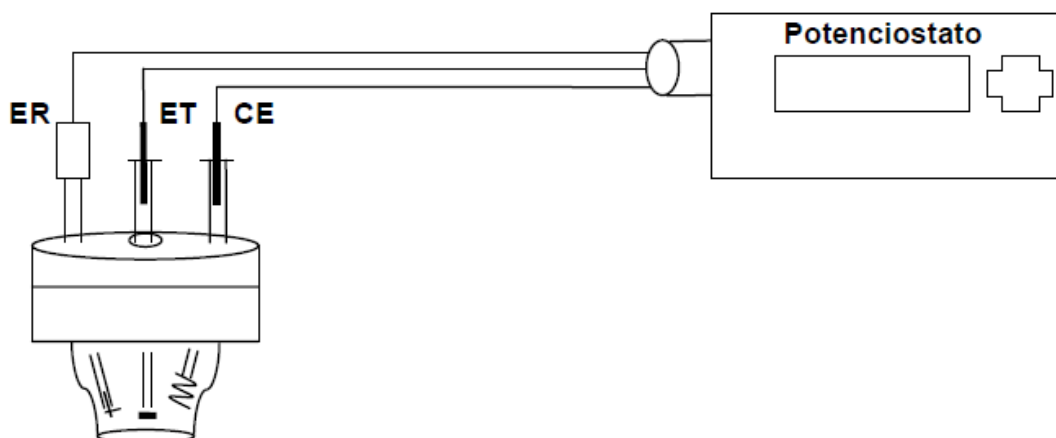


Figura 12: Representação do sistema de medidas eletroquímicas adotado (ER: eletrodo de referência, ET: eletrodo de trabalho e CE: contra eletrodo)

3.5. Otimização das condições de preparação e análise do biossensor

Em busca da melhor condição experimental para a determinação da Penicilina G, alguns parâmetros relevantes para a melhor confecção do biossensor e para a realização das medidas foram estudados.

Para isso, foram estudados o tipo de imobilização enzimática, diversos mediadores, a quantidade de mediador e de enzima na composição da pasta. Em relação às análises foram avaliadas a influencia do pH, do tipo de solução tampão e da concentração do tampão, assim como o potencial que deveria ser aplicado nas medidas amperométricas.

3.6. Avaliação da área ativa do biossensor proposto

Para verificar a área ativa do biossensor desenvolvido, foram realizados ensaios por voltametria cíclica nas condições otimizadas para a preparação da pasta modificada. Os experimentos foram realizados em 10,0 mL de solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH = 7,5) com adição de 500 µL de ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio, ambas as soluções 5 mmol L⁻¹, variando a velocidade de varredura (ν) de forma sucessiva.

3.7. Aplicação do biossensor na detecção de Penicilina G em leite de vaca cru

Com a finalidade de verificar a resposta do biossensor na matriz de interesse, foram realizados testes com leite de vaca cru intencionalmente contaminado com solução padrão de antibiótico (Penicilina G), resultando em amostras com 3,00x10⁻² mol.L⁻¹ de antibiótico.

Os ensaios foram realizados empregando a calibração externa (curva analítica) e para descarte do efeito da matriz, foram registrados amperogramas, com valor de potencial igual a -250 mV, para adições de solução padrão de Penicilina G (3,00x10⁻² mol.L⁻¹), alternadas por adições de da amostra de leite contaminada, em uma célula eletroquímica preenchida com 10 mL de solução tampão fosfato pH 7,5, de forma que o teor de Penicilina G fosse o mesmo tanto na solução padrão como na amostra contaminada.

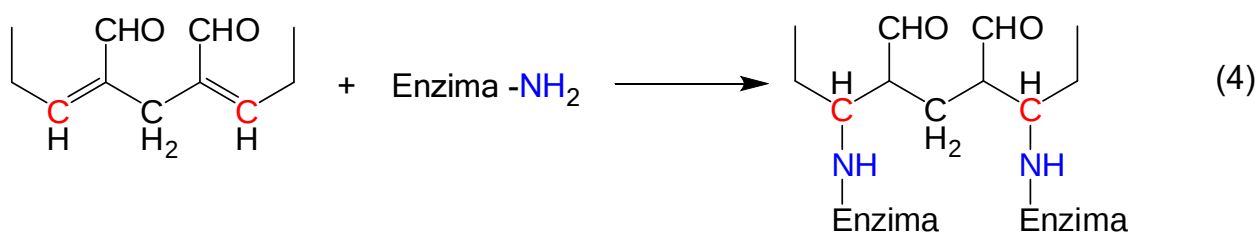
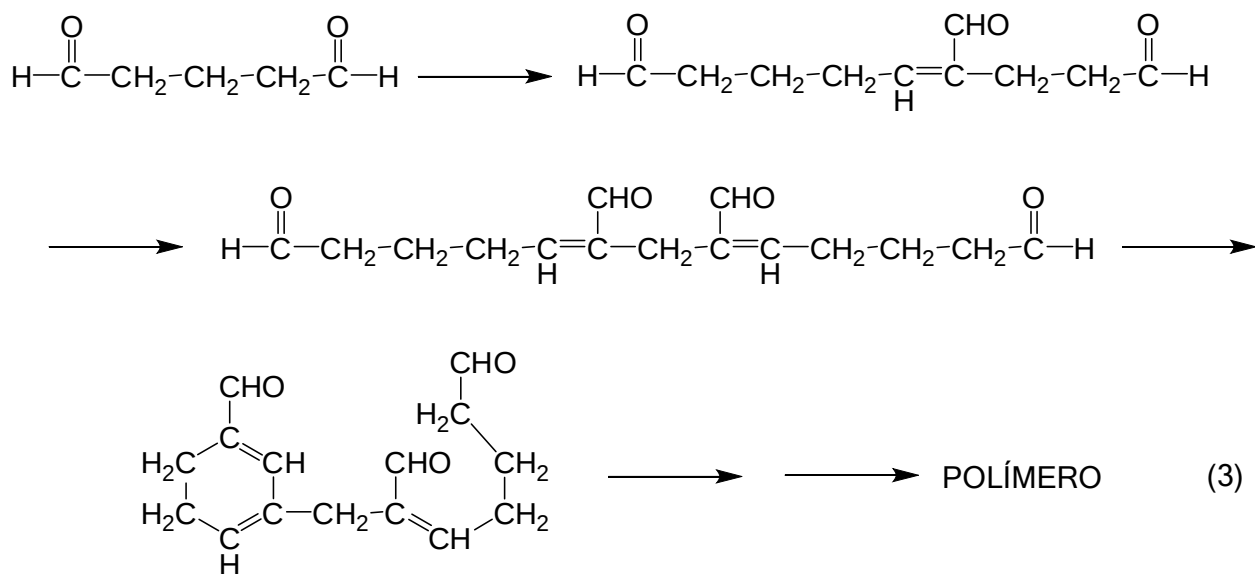
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização do método de imobilização e escolha do mediador de elétrons

4.1.1. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA POR LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA COM GLUTARALDEÍDO: MÉTODO I

Inicialmente foi empregada a ligação covalente cruzada com o reagente bifuncional glutaraldeído por se tratar de uma técnica amplamente usada para a imobilização de enzimas (que são solúveis em água) em matrizes sólidas como o grafite, com a finalidade de evitar a lixiviação das mesmas no meio de análise,

O glutaraldeído, apresenta-se em forma comercial como soluções aquosas entre 25% e 50% (m/v), e encontra-se na forma de oligômeros insaturados ou polímeros gerados via condensações aldólicas repetidas^{26,27} (reação 3), e que ajuda a explicar o mecanismo pelo qual as enzimas podem ser ligadas através das reações cruzadas (reação 4). A característica principal do mecanismo da reação 4, é a adição tipo Michael dos grupos amino da proteína ao polímero aldeídico α,β -insaturado^{26,27}, permitindo assim sua ligação de caráter covalente com o reagente bifuncional.



Entretanto, apesar da ligação entre a enzima e o glutaraldeído permitir obter um ambiente mais adequado para a estabilização da enzima. Quando em contato com o grafite, através de interações de adsorção, o acoplamento da enzima ao suporte não foi o mais adequado, e desta forma, nenhum aumento de corrente em toda a extensão do voltamograma foi observado.

No voltamograma apresentado na Figura 13 para a pasta contendo a enzima β -lactamase e o mediador de elétrons ferroceno foi empregado a variação de potencial dentro do intervalo de -300 mV a 500 mV, sendo observada a tendência à formação do pico de oxidação do ferroceno na região de potencial em torno de 500 mV. Quando é feita a adição do analito (Penicilina G), observa-se uma diminuição na área do

voltamograma, demonstrando hipoteticamente a instabilidade da pasta e a inexistência de sinal significativo para a determinação do analito.

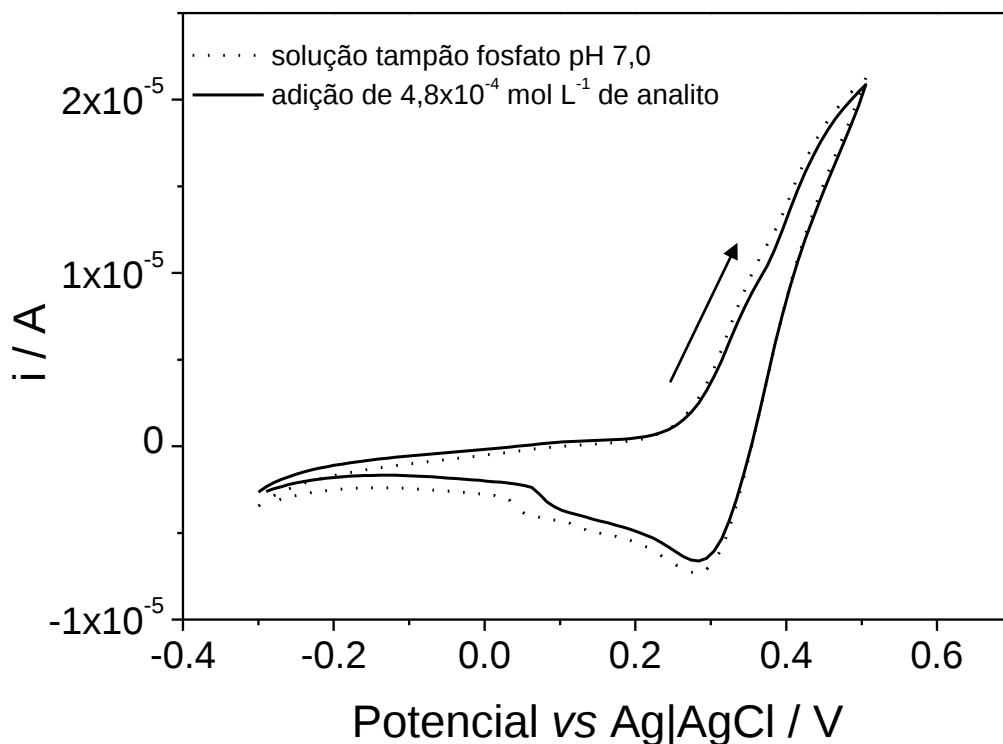


Figura 13: Resposta do biossensor construído à base de ligação cruzada com glutaraldeído, β -lactamase e ferroceno, $\nu = 20 \text{ mV.s}^{-1}$.

Resultados parecidos foram obtidos quando foi testada a pasta contendo a enzima β -lactamase e o mediador de elétrons ftalocianina de cobalto (CoPc), Figura 14, ocorrendo picos de redução que podem ser atribuídos ao mediador CoPc, e com nenhuma mudança aparente na área do voltamograma quando foi adicionado o analito.

Apesar de não ter sido realizado um estudo exaustivo com outros mediadores de elétrons, considerou-se necessária a mudança do método de imobilização da enzima β -lactamase na superfície de grafite, visando melhorar a estabilidade da enzima no suporte de grafite, e para isto, procurou-se ligar covalentemente a enzima ao grafite.

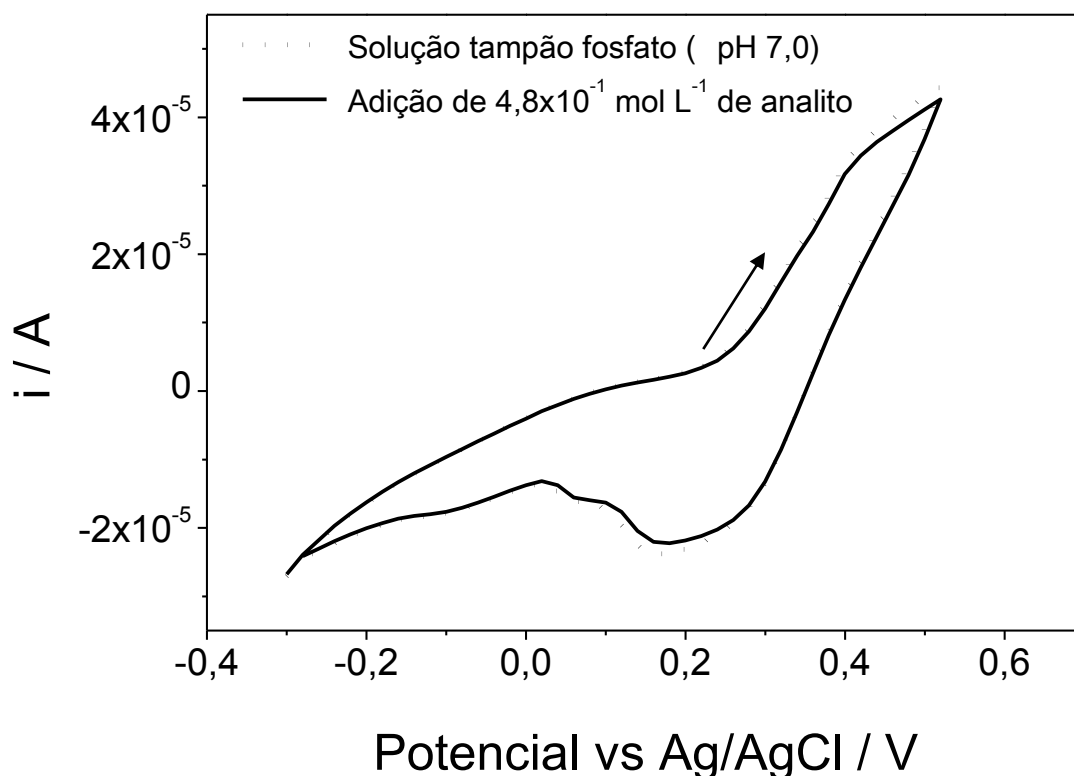


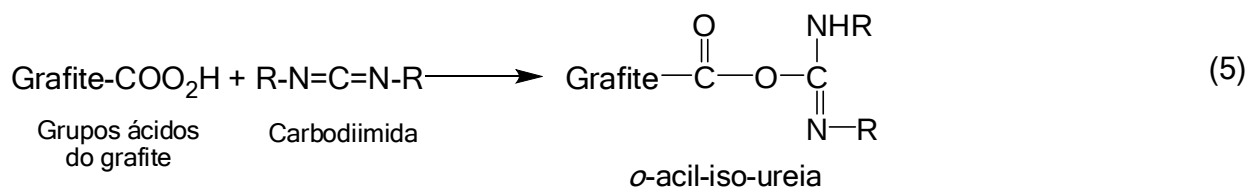
Figura 14: Resposta do biossensor construído à base de ligação cruzada com glutaraldeído, β -lactamase e CoPc, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

4.1.2. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA POR LIGAÇÃO COVALENTE: MÉTODO II

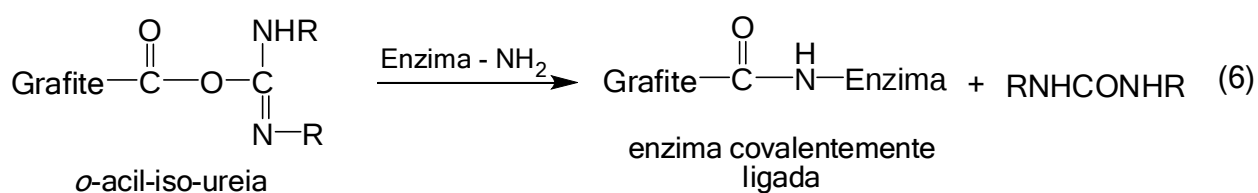
Um método bastante adequado para a imobilização covalente de compostos biológicos, como enzimas e anticorpos, baseia-se no uso de compostos derivados da carbodiimida, uma vez que permite manter a atividade e estruturas tridimensionais desses compostos inalteradas.

A reação entre superfícies carboxiladas, como o grafite, e a carbodiimida é mostrada na reação 5, esta reação forma o grupo *o*-acil-iso-ureia, que será o responsável pelo acoplamento covalente da enzima ao suporte sólido (reação 6).

1) Ativação do grafite



2) Ligação da enzima



Assim, neste trabalho, foram preparadas pastas de carbono modificadas com a enzima por ligação covalente com CDI e diferentes mediadores de elétrons. Cada biossensor foi avaliado pelo perfil voltamétrico na presença de Penicilina G, e os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 15 e 16.

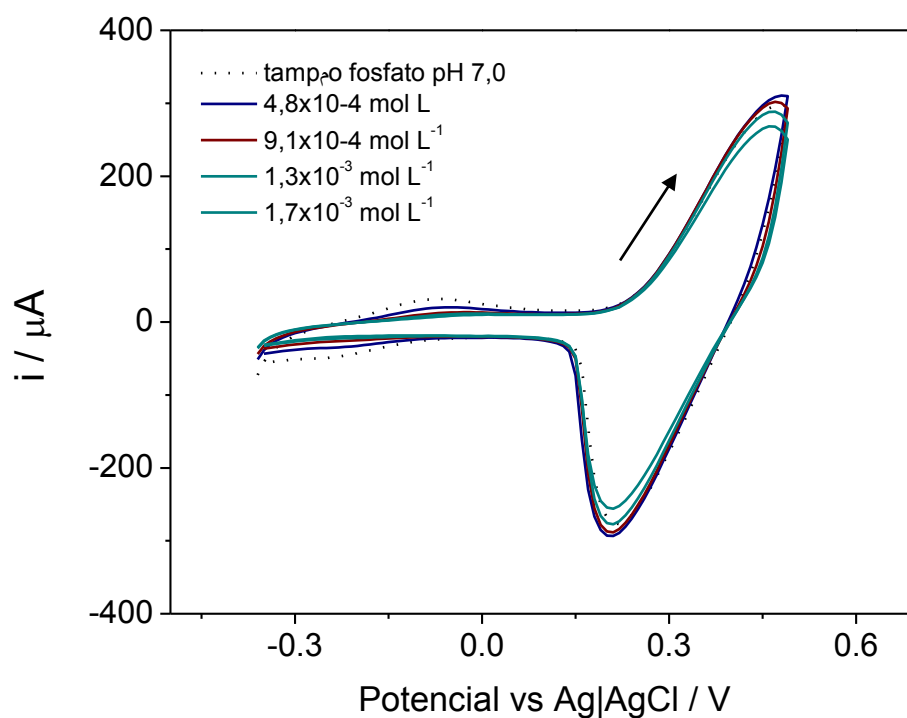


Figura 15: Voltamogramas obtidos para o biossensor com β -lactamase imobilizada por ligação covalente usando ferroceno como mediador de elétrons. Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

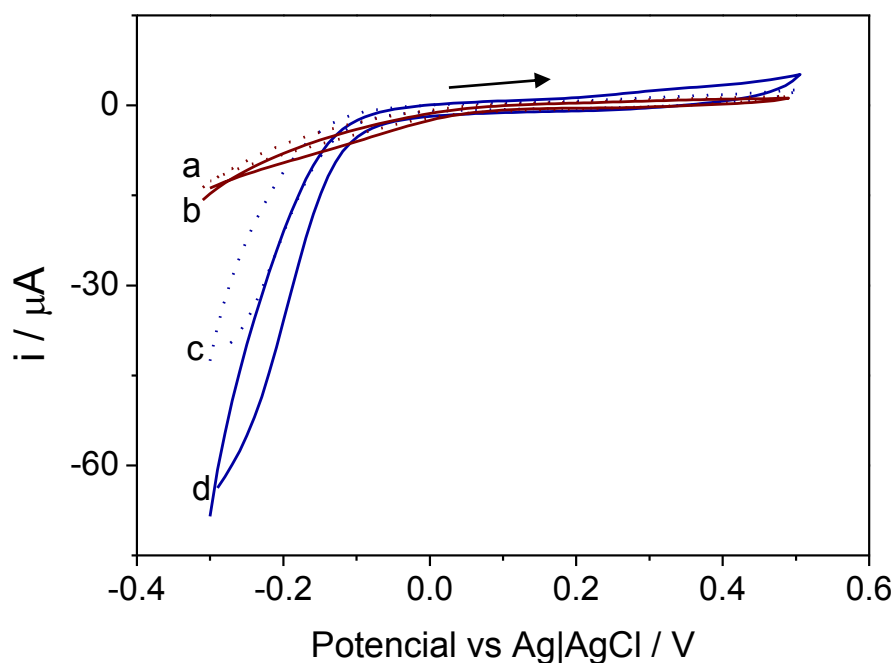


Figura 16: Voltamogramas obtidos para o biossensor com β -lactamase imobilizada por ligação covalente usando CoPc como mediador de elétrons. (a) pasta de carbono modificada apenas com enzima; (b) sensor em (a) + substrato; (c) biossensor à base de pasta modificada com CoPc e β -lactamase; e (d) biossensor em (c) + penicilina G. Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), $4,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Penicilina G e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

Pode se observar da Figura 15 que nenhum sinal satisfatório foi obtido para o biossensor preparado usando como mediador de elétrons ferroceno, que é amplamente usado na construção de biossensores amperométricos. Resultados análogos foram obtidos usando TCNQ (Tabela 3).

Quando é empregado o mediador de elétrons CoPc, Figura 16 (voltamograma d), ocorre a redução eletroquímica do analito ocasionada pelo efeito sinérgico entre a enzima e a ftalocianina de cobalto, sendo observado o aumento da corrente de redução conforme a concentração de substrato aumentou na célula de medida

Tabela 3: Mediadores de elétrons testados empregando a técnica de voltametria cíclica.

Mediador de elétrons	Variação de corrente
CoPc	Sim
Ferroceno	Não
TCNQ	Não

A Figura 17 apresenta um possível mecanismo de resposta para o biossensor desenvolvido à base de enzima β -lactamase e ftalocianina de cobalto (II), o qual foi baseado no mecanismo de ação das metalo- β -lactamase mostrado na Figura 4.

Nesse mecanismo, que deve ocorrer por um processo CE (químico/eletroquímico), inicialmente na etapa química a enzima promove a redução do analito com concomitante oxidação do mediador de elétrons, mantendo a enzima em sua forma original. A seguir, na etapa eletroquímica, a regeneração da forma reduzida do mediador ocorre pela aplicação do potencial adequado, e a quantidade de elétrons transferidos nessa redução será proporcional à concentração de analito na amostra.

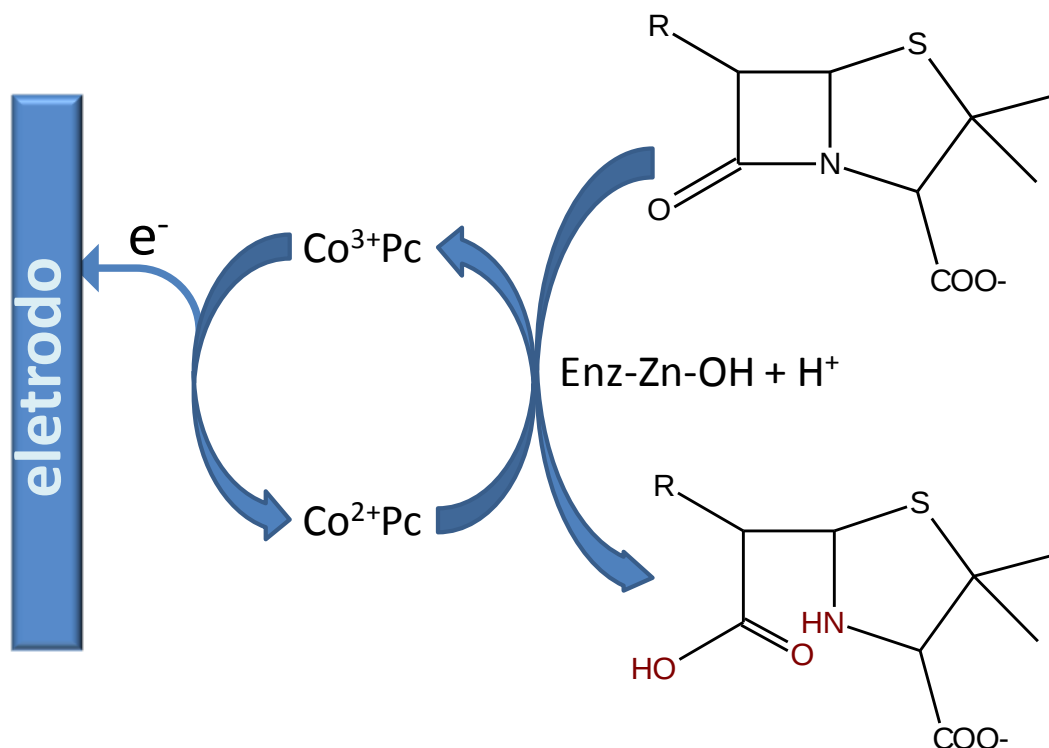


Figura 17: Mecanismo proposto para a ação da CoPc como mediador de elétrons no biossensor.

Visto então, que imobilizando a enzima covalentemente ao suporte de grafite e usando como mediador de elétrons a CoPc, foram obtidos os resultados mais promissores, a seguir iniciaram-se os respectivos experimentos para otimização da resposta analítica do biossensor.

4.2. Otimização da preparação e resposta do biossensor

Com a finalidade de otimizar a resposta do biossensor proposto, alguns parâmetros que afetam diretamente sua sensibilidade e seletividade foram avaliados. Estes foram; a quantidade de CoPc na pasta; os parâmetros da solução tampão como: o tipo, pH e concentração; e uma vez que o biossensor desenvolvido usava uma transdução amperométrica, o potencial usado nas medidas também foi avaliado.

Inicialmente, foi observado que aplicando um potencial na amperometria de -100 mV vs Ag|AgCl no biossensor, ocorria um aumento bastante acentuado da corrente de redução na presença do analito, quando comparado ao amperograma obtido com eletrodo de pasta de carbono funcionalizada apenas com CDI (Figura 18), indicando a importância da presença da enzima e do mediador de elétrons na preparação do biossensor.

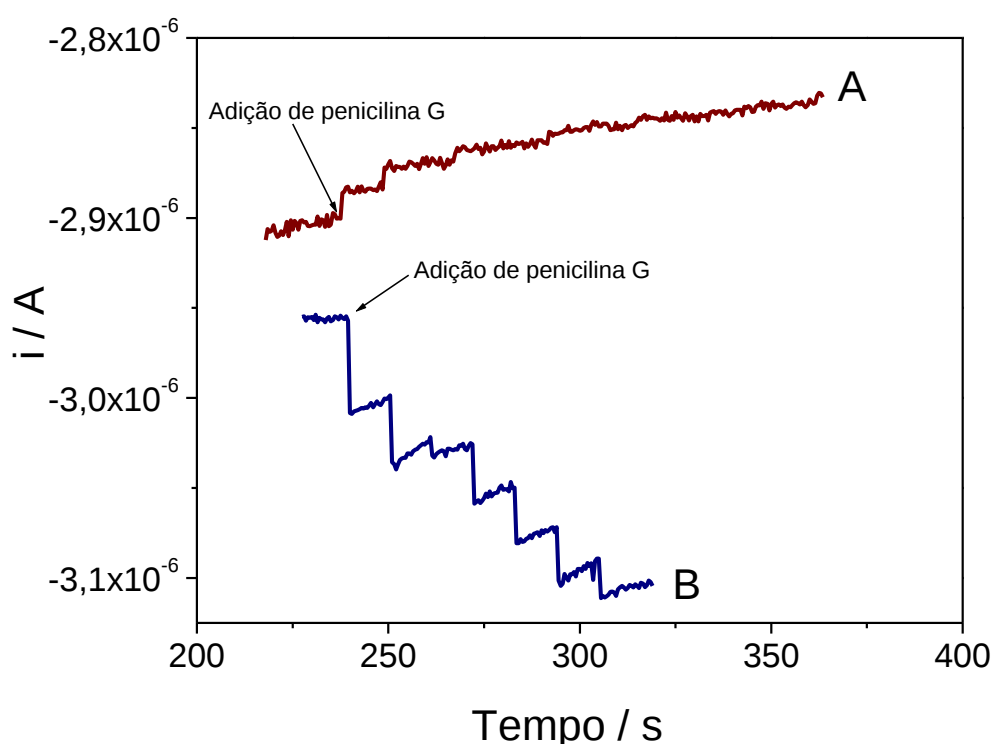


Figura 18: Amperogramas obtidos em -100 mV, com um eletrodo de pasta de carbono funcionalizada com CDI (A) e com o biossensor proposto (B). Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), e adições sucessivas de $9,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de substrato.

Pelos resultados mostrados na Figura 18, a presença de CoPc junto com a enzima, se faz necessária para o funcionamento satisfatório do biossensor para quantificação da penicilina G, uma vez que a pasta sem a presença do mediador não apresentou estabilidade para a realização das medidas.

A seguir, visando otimizar o potencial a ser aplicado no biossensor, foi realizado o estudo da influência do potencial na sensibilidade do método, e a Figura 19, mostra que aplicando potencial de -250 mV, obteve-se a maior sensibilidade. Para potenciais mais negativos que -250 mV foi observado adsorção dos produtos da reação na superfície do eletrodo proporcionando o bloqueio da mesma (gráfico inserido na Figura 19), não sendo mais adequada para medidas quantitativas.

Por outro lado, potenciais muito elevados poderiam desnaturar a enzima e adicionalmente, comprometer a seletividade do método, uma vez que, a matriz a ser analisada será o leite, o qual é um fluido heterogêneo e complexo contendo muitos componentes em dispersão, podendo ter algumas espécies eletroativas presentes, que podem ser identificadas em elevados potenciais²⁸, tanto de redução, quando de oxidação, e neste sentido o uso de potenciais com os menores valores possíveis, se torna necessário.

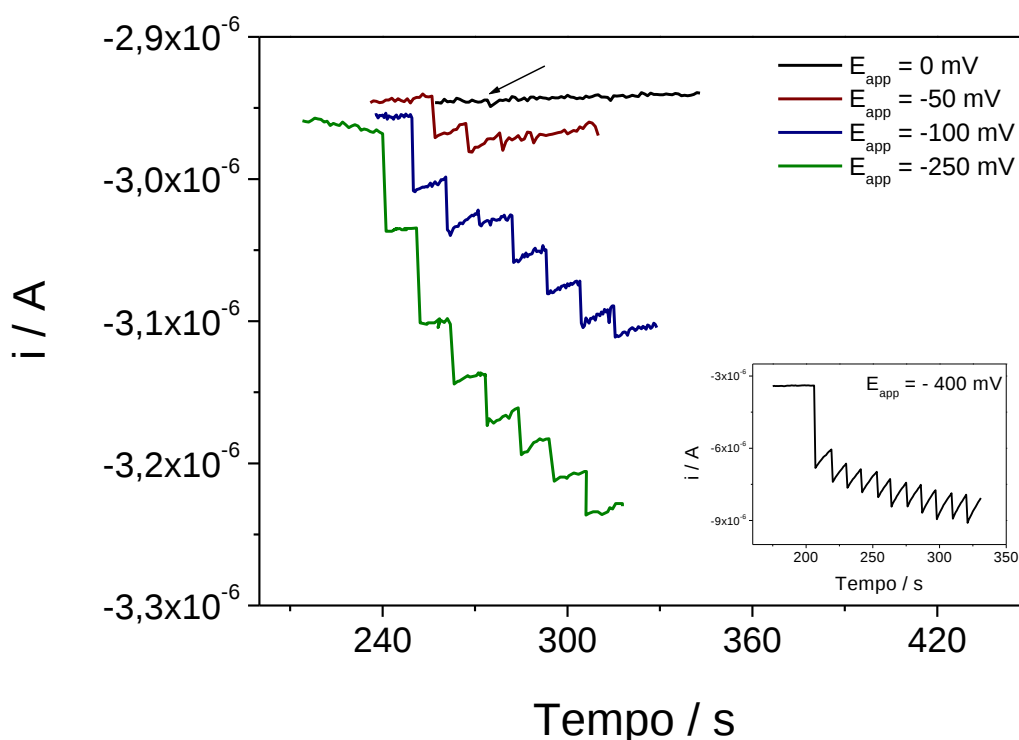


Figura 19: Amperogramas obtidos no estudo de potencial aplicado ao biossensor. Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), e adições sucessivas de $9,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de substrato.

Uma vez escolhido o potencial a ser usado nas análises amperométricas, o seguinte estudo a ser realizado foi a avaliação do pH mais adequado para a realização das medidas, e a Figura 20 mostra a resposta do biossensor obtida em soluções tampão fosfato em diversos pH, mostrando que a maior sensibilidade é obtida em pH 7,5. Assim a partir deste estudo os demais experimentos foram realizados em soluções com pH 7,5.

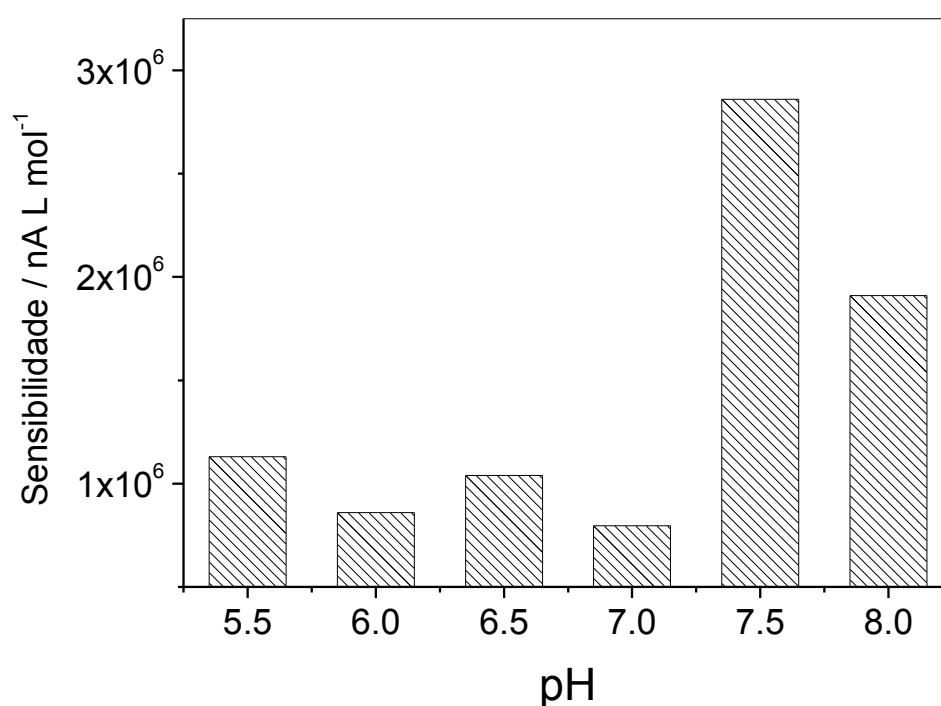


Figura 20: Influência do pH na sensibilidade do biossensor.

Os demais experimentos que dizem respeito à influência da quantidade de mediador na preparação da pasta, o tipo de tampão e a concentração do mesmo, foram realizados e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Condições otimizadas para a determinação de Penicilina G usando biossensor à base de pasta de carbono modificada com grafite funcionalizado com CDI e CoPc.

Parâmetros e quantidades avaliadas							Otimizado
Quantidade de mediador na pasta (mg / 100 mg)	7,5	10	---	---	---	---	10
pH	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	7,5
Tampão	Fosfato	Hepes	Pipes	TRIS	PBS	---	Fosfato
[Tampão] / mol L ⁻¹	0,025	0,05	0,075	0,10	---	---	0,05
Potencia aplicado / mV	-400	-250	-100	-50	0	---	-250

PBS: solução tampão fosfato salina.

Assim, a Tabela 4 mostra que o biossensor preparado com 10 mg de CoPc e 100 mg de grafite funcionalizado com CDI contendo 10 U de enzima imobilizada apresentou os melhores resultados quando, as medidas foram realizadas em meio de solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ e pH 7,5, que é um valor abaixo do ponto isoeletrico da enzima (pI = 8,6) encontrado para a β -lactamase de classe B na literatura²⁹.

Com o pH do meio abaixo do ponto isoeletrico da enzima, esta fica carregada positivamente e o mecanismo de transferência de elétrons do transdutor para a superfície do eletrodo é facilitado.

4.3. Perfil de resposta para o biossensor otimizado

Sob as condições otimizadas o sensor mostrou o perfil amperométrico de resposta mostrado nas Figuras 21 e 22.

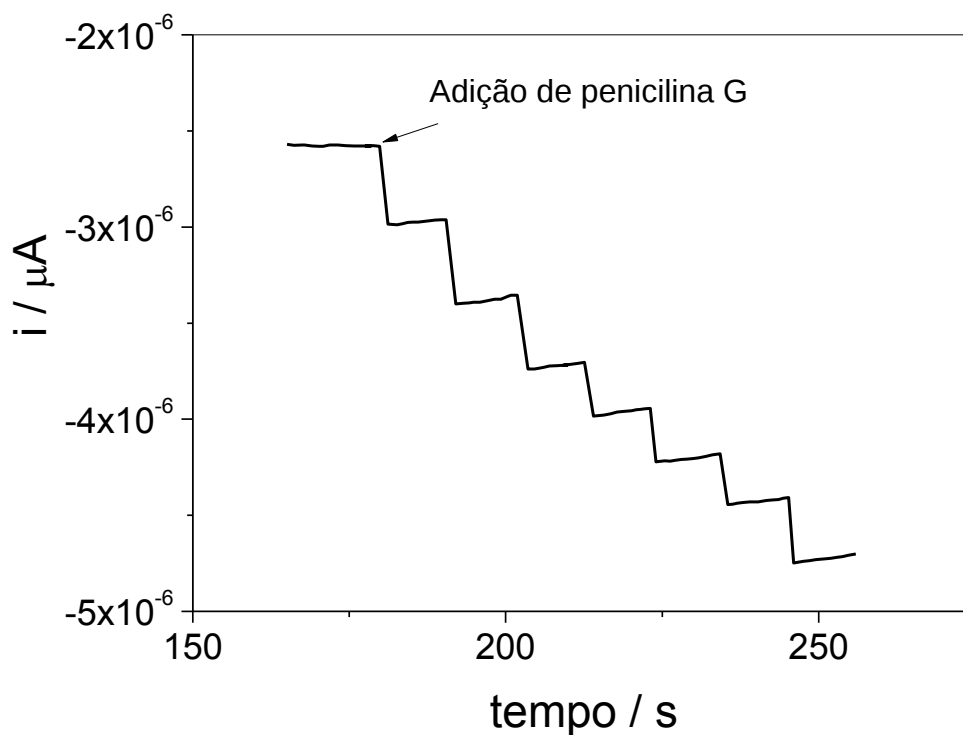


Figura 21: Perfil de resposta do sensor nas condições otimizadas. Adições sucessivas de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Penicilina G em uma solução tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} (pH 7,5).

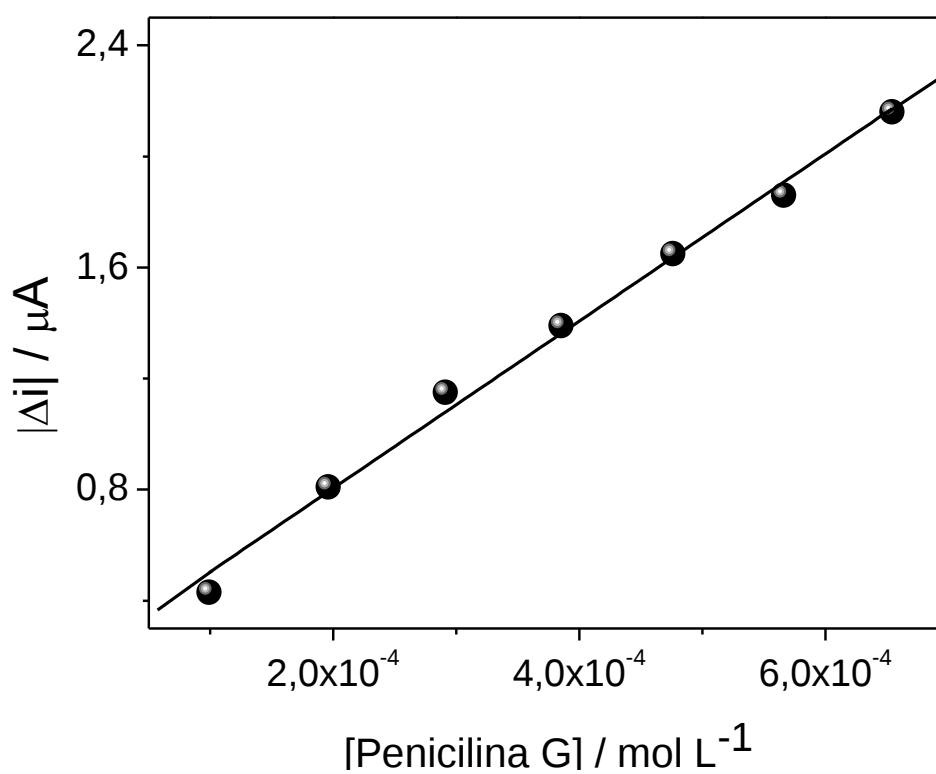


Figura 22: Curva analítica típica plotada com o gráfico da Figura 21.

Os dados da Figura 22 são mostrados na equação 3 a seguir:

$$\Delta i / \mu A = 0,20(\pm 0,04) + 3010(\pm 107)[Penicilina\ G] / mol\ L^{-1} \quad (3)$$

A otimização da preparação da pasta de carbono e dos parâmetros para realização das medidas amperométricas permitiu obter uma faixa linear de resposta para a Penicilina G entre $9,9 \times 10^{-5}$ e $6,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com uma inclinação de 3010 ± 107 $\mu A\ L\ mol^{-1}$ e limites de detecção e quantificação de $1,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $4,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente, os quais foram calculados conforme recomendado pela ANVISA³⁰. O limite de detecção (LOD) foi calculado como três vezes o desvio padrão do coeficiente linear (**a**, obtido da média de três curvas analíticas) dividido pelo coeficiente angular médio dessas três curvas analíticas (**b**, sensibilidade média), $3 \times \sigma_a / b$. O limite de quantificação (LOQ), foi calculado como 3,3 vezes o valor do LOD ($10 \times \sigma_a / b$). A Tabela 5 mostra as características analíticas do biossensor proposto.

Tabela 5: Características analíticas mostradas pelo biossensor para determinação de Penicilina G.

Parâmetros / unidade	Resposta
Faixa Linear / mol L ⁻¹	$9,9 \times 10^{-5}$ e $6,5 \times 10^{-4}$
Sensibilidade / $\mu A\ L\ mol^{-1}$	3010 ± 107
Coeficiente de Correlação (n = 7)	0,9962
Limite de detecção / mol L ⁻¹	$1,3 \times 10^{-5}$ (4,6 ppm)
Limite de quantificação / mol L ⁻¹	$4,4 \times 10^{-5}$ (15,3 ppm)
Repetibilidade intra-dia (RSD, n=5, [analito] = $3,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹)	3,4%

A repetibilidade intra-dia da resposta do biossensor pode ser verificada através dos valores obtidos para o desvio padrão médio relativo (RSD) da corrente observada para uma concentração do analito de $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, registrada 5 vezes no mesmo

dia, e que ao ser inferior a 5%, atesta a confiabilidade na precisão das medidas obtidas com o biossensor proposto.

4.4. Estimativa da área eletroquimicamente ativa do biossensor

Visando ter uma estimativa de qual seria a área eletroquimicamente ativa do biossensor construído, foi realizado um experimento em voltametria cíclica variando a velocidade de varredura (Figura 23), com a finalidade de obter dados da corrente de pico de oxidação anódico (I_{pa}) em função da $\nu^{1/2}$ (Figura 24) para com a aplicação da equação de Andreux e Savèant³¹ (Equação 4) poder calcular a área ativa do biossensor.

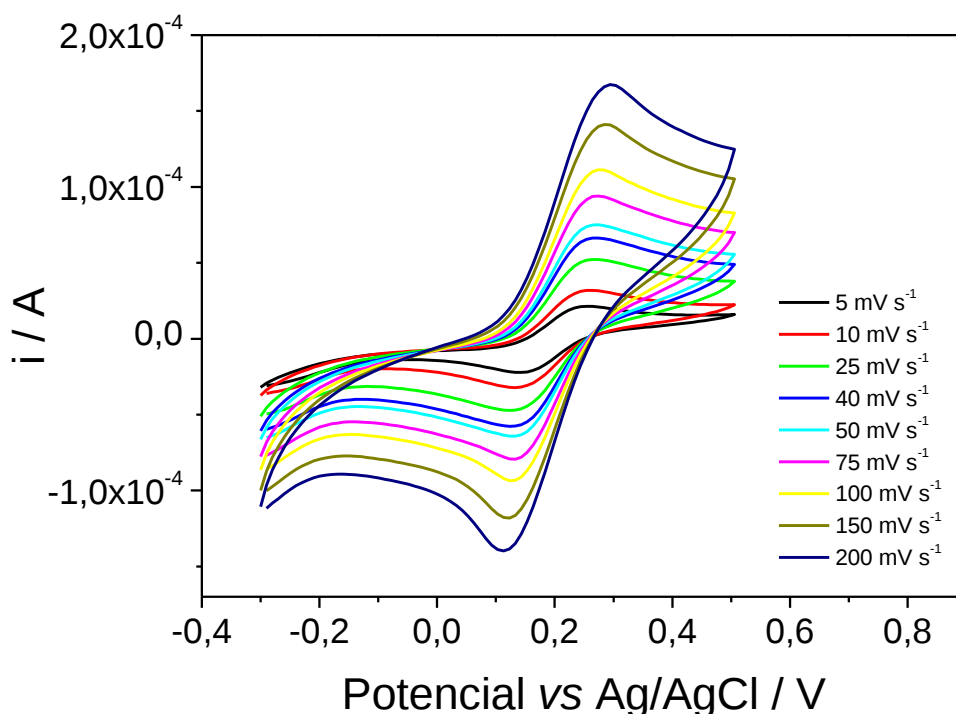


Figura 23: Voltametrias cíclicas obtidas através de diferentes velocidades de varredura. Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) e $K_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] = K_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

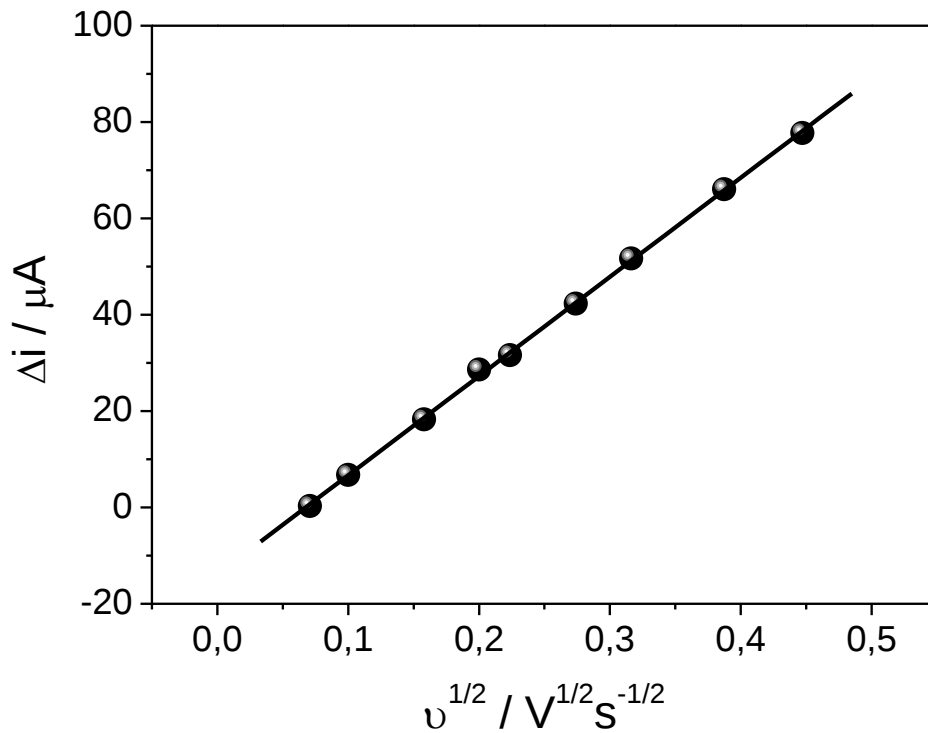


Figura 24: Perfil linear da variação de corrente (Δi_{pa}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

Com a eq. 4 e com a equação que mostra o ajuste linear da Figura 24 (equação 5, $R = 0,9997$), foi possível calcular a área ativa do biossensor desenvolvido.

$$i_p = 0,496FAC_s D_0^{1/2} \left(\frac{F}{RT} \right)^{1/2} v^{1/2} \quad (4)$$

$$\Delta i / \mu A = -13,9(\pm 0,9) + 205,9(\pm 1,8) v^{1/2} \quad (5)$$

A equação 6, indica a igualdade usada e a equação 7 o valor obtido.

$$0,496FAC_s D_0^{1/2} \left(\frac{F}{RT} \right)^{1/2} = \text{inclinação da reta} = 205,9 \times 10^{-6} \quad (6)$$

onde: O valor da inclinação da reta é apresentado em ampére, $C_s = 2,5 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$; $F = 96485 \text{ C.mol}^{-1}$; $R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$; $T = 298 \text{ K}$; $D_0 = 7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e A é a área ativa do eletrodo a ser calculada.

$$A = \text{AREA ELETROQUIMICAMENTE ATIVA} = 0,10 \text{ cm}^2 \quad (7)$$

Esta área calculada indica que 77% da área geométrica do eletrodo é eletroquimicamente ativa devido a irregularidade da superfície do filme, uma vez que a área geométrica total é de aproximadamente $0,13 \text{ cm}^2$.

4.5. Comportamento da cinética enzimática no biossensor

Através dos dados obtidos para as condições ótimas foi realizado o estudo sobre a cinética enzimática do biossensor que apresentou perfil hiperbólico, Figura 25, que tal como esperado segue a cinética de “Michaelis-Menten”.

Ao ser plotado o gráfico do duplo recíproco ou de Lineweaver-Burker (Figura 26), foi possível estimar o valor da constante aparente de Michaelis-Menten (K_{MM}^{app}). Obtendo-se um valor de $1,73 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, mol L^{-1} (equações 8 – 10), quando comparado com o valor informado pelo fornecedor da enzima em solução (Sigma-Aldrich®), $6,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, indica boa coerência, e ainda sendo ligeiramente maior (tal como esperado), logo que a solução de enzima imobilizada mantém os sítios ativos das moléculas expostos, conservando a característica de afinidade pelo seu substrato e mantendo suas propriedades catalíticas.

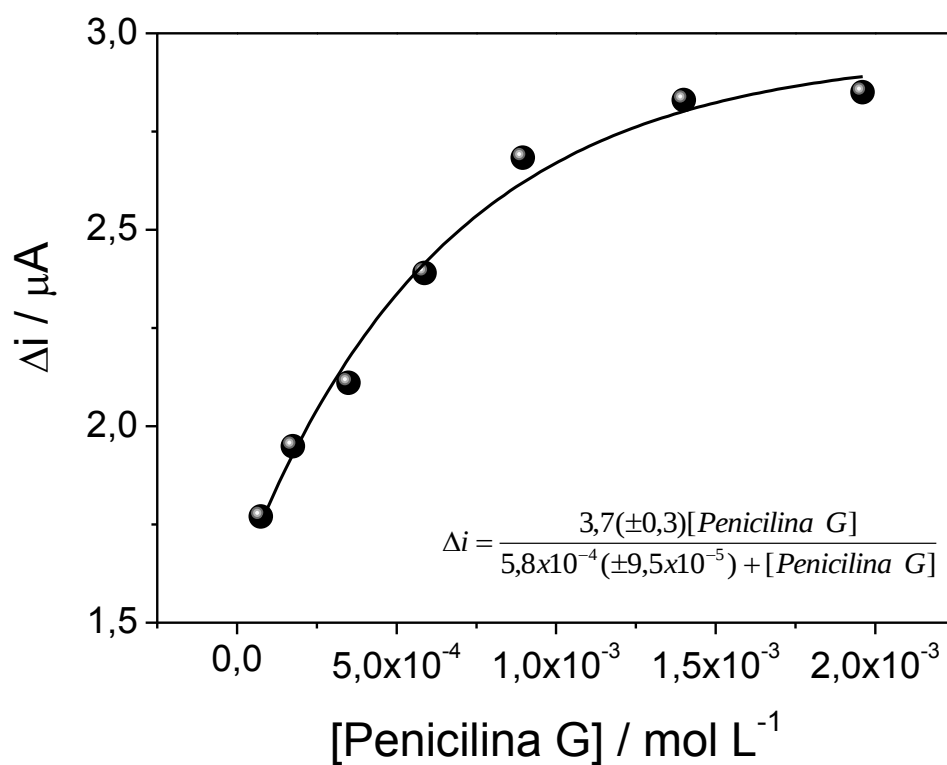


Figura 25: Perfil hiperbólico do biossensor à base β -lactamase

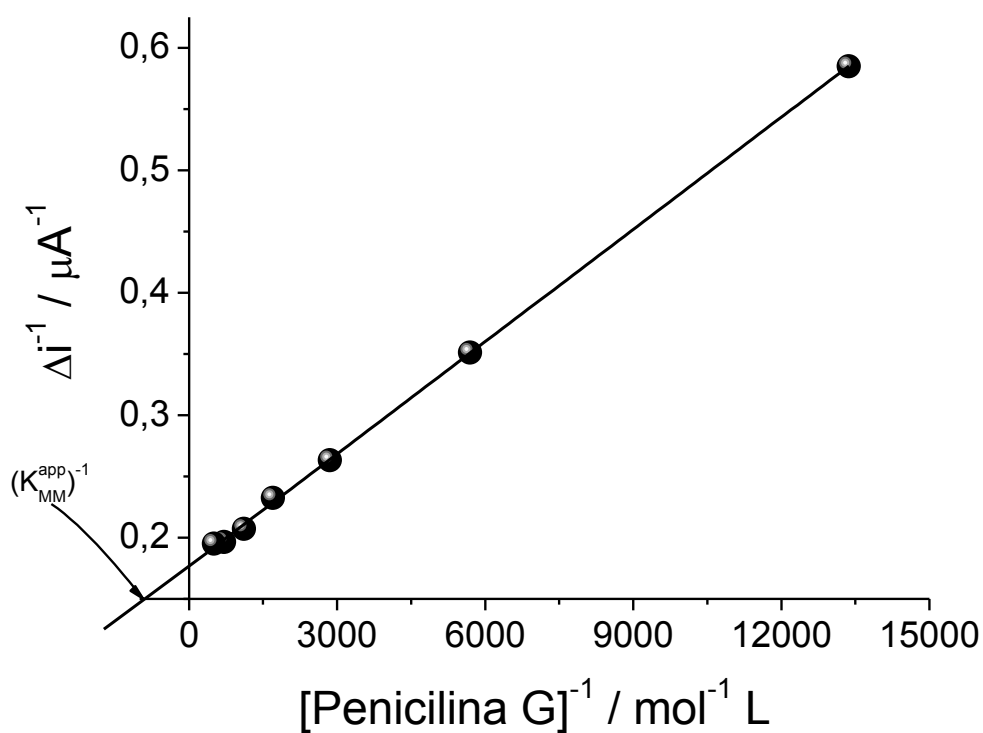


Figura 26: Perfil do comportamento do biossensor pelo duplo-recíproco

A regressão linear para a reta da Figura 26 (ajustada com um $R = 0,9996$) é dada na equação 8,

$$\Delta i^{-1} / \mu A^{-1} = 0,177(\pm 0,001) + 3,06 \times 10^{-5} (\pm 2,6 \times 10^{-7}) [Penicilina\ G]^{-1} / mol^{-1} L \quad (8)$$

Extrapolando a reta para o valor de zero, têm-se:

$$0 = 0,177 + 3,06 \times 10^{-5} \left(\frac{1}{K_{MM}^{app}} \right) / mol^{-1} L \quad (9)$$

A equação 9, permite calcular o valor da K_{MM}^{app} :

$$K_{MM}^{app} = - \left(\frac{3,06 \times 10^{-5}}{0,177} \right) mol\ L^{-1} = 1,73 \times 10^{-4} mol\ L^{-1} \quad (10)$$

4.6. Aplicação do biossensor em leite de vaca cru.

Amostras de leite de vaca cru isentas de antibióticos β -lactâmicos, confirmado pelo resultado negativo com kit CMT, foram contaminadas com solução de Penicilina G e submetidas a testes de detecção através do biossensor amperométrico desenvolvido.

A curva analítica usada para quantificação da penicilina G no leite é mostrada na Figura 27, cuja reta foi ajustada ($R = 0,9943$) segundo a equação linear (11).

$$\Delta i / \mu A = 1,70(\pm 0,04) + 1.234(\pm 76) [Penicilina\ G] / mol\ L^{-1} \quad (11)$$

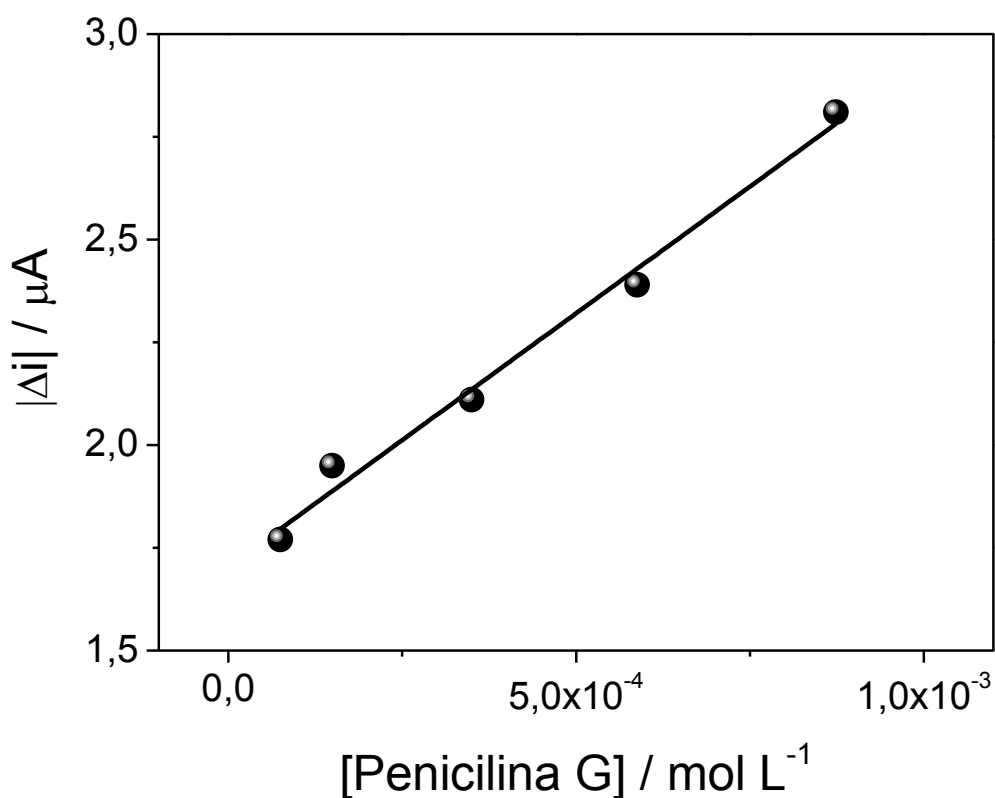


Figura 27: Curva analítica usada na aplicação do biossensor na análise de leite de vaca cru.

No intuito de verificar se haveria algum efeito da matriz nas análises do leite, foram plotados vários amperogramas, nos quais foi adicionado antes e/ou após um padrão de concentração conhecida e igual ao da amostra, e os resultados obtidos são mostrados na Figura 28.

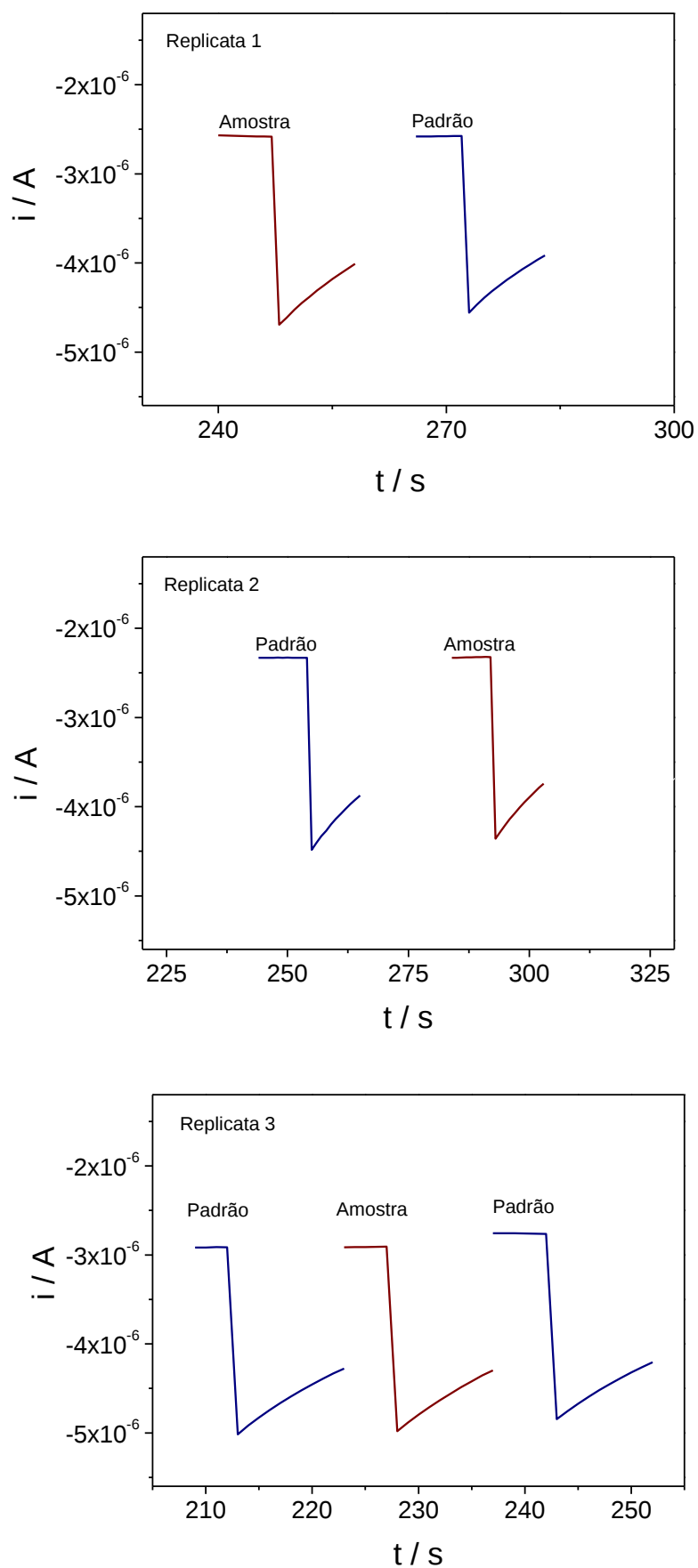


Figura 28: Sinais obtidos para as três replicatas da amostra e comparação com soluções padrão de penicilina G, na concentração de $3,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na cela de medida.

Os resultados apresentados na Figura 28 mostram claramente que a resposta do biossensor não é afetada por efeito de matriz da amostra de leite cru, o que é bastante vantajoso em relação a outros métodos de análise nos quais é necessário o pré-tratamento da amostra.

As concentrações de Penicilina G (Mm: 356,37 g mol⁻¹) calculadas para as replicatas 1, 2 e 3 da amostra contaminada com 0,030 mol L⁻¹ de analito, foram de 0,033; 0,028 e 0,030 mol L⁻¹, respectivamente. Resultando em uma detecção média de $3,03 \times 10^{-2} \pm 2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, um erro relativo de 1%, e uma percentagem média de recuperação igual a 101,1(± 8,4)%. Observa-se que o método é bastante exato, e em relação à precisão, calculada com base no valor de RSD (8,3%, n=3), o valor obtido para as replicatas, pode ser considerado bom, uma vez que o leite é uma matriz bastante complexa, e é aceitável e esperado, obter valores próximos a 10% para o desvio padrão.

5. CONCLUSÕES

5.1. Este trabalho descreve pela primeira vez um biossensor amperométrico de segunda geração, para detecção de antibióticos β -lactâmicos, baseado na modificação de uma pasta de carbono com a enzima β -lactamase da classe B (uma metalo-enzima) e com o mediador de elétrons CoPc.

Os estudos realizados evidenciaram que o uso da pasta de carbono com a enzima presente concomitantemente com o mediador geram um efeito sinérgico na redução do analito, a qual permite obter um limite de quantificação de 15,3 ppm e repetibilidade intra-dia (RSD, $n = 5$) igual a 3,4 %, sendo estes resultados satisfatórios pelo fato de não ter sido realizado pré-tratamento da amostra, tornando a aplicação da metodologia simples .

5.2. Embora ainda devam ser realizados ajustes para diminuir o limite de detecção (LOD = 4,6 ppm) e poder concorrer com o kit comercial (LOD = 1 a 2 ppb) usado na indústria de alimentos, esta primeira tentativa se mostra bastante promissora, uma vez que outras alternativas para a construção do biossensor poderão ser exploradas. Como por exemplo, usar nanotubos de carbono (NTC), modificar eletrodos impressos contendo NTC, CoPc e enzima ligada covalentemente, ou ainda, uma proposta que já está sendo elaborada neste grupo de pesquisa, envolvendo o uso de eletrodos de ouro com monocamadas auto-organizadas (Anexo).

REFERÊNCIAS

- 1 SILVA, P. H. F. Leite: aspectos de composição e propriedades. **Química Nova na Escola**, v. 6, p. 3-5, nov. 1997.
- 2 MILKPOINT ESTATÍSTICAS. **Produção de leite**: países selecionados. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/producao_mundia>. Acesso em: 11 ago. 2011.
- 3 LEITBOM. **Como valorizar seu leite**. Disponível em: <www.leitbom.com.br/produtor>. Acesso em: 27 nov. 2008.
- 4 VITAFORT. **Programa de controle biológico das mastites**. Disponível em: <www.vitafort.com.br/programas_bio>. Acesso em: 27 nov. 2008.
- 5 COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S. et al. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 442-455.
- 6 SILVA, M. V. M.; SARMENTO, A. M. C.; FRANCA, A. P. **Resíduos de antibióticos no leite e seus efeitos na saúde pública**: uma preocupação constante. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos>>. Acesso em: 11 ago. 2011.
- 7 NUNES, M. T.; D'ANGELINO, J. L. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite em fazendas produtoras e no leite pronto para consumo. **Revista Higiene Alimentar**, v. 21, p. 57-61, mar. 2007.
- 8 MEDEIROS, N. G. A.; CARVALHO, M. G. X.; LEITE, E. O.; PEREIRA, J. M.; PONTES, M. P. S. Detecção de antibióticos no leite *in natura* consumido no município de Patos-PB. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 4., 1999, Recife. **Anais...** Recife: SPEMVE, 1999. p. 225-226.
- 9 ALBUQUERQUE, L. M. B.; MELO, V. M.; MARTINS, S. C. S. Investigação sobre a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado em Fortaleza. **Revista Higiene Alimentar**, v. 10, n. 41, p. 29-32, 1996.
- 10 MATAGNE, A.; BRASSEUR, L.; FRÈRE, J. M. Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity. **Journal of Biochemistry**, v. 330, p. 581-598, 1998.
- 11 BOOTH, N. H. Toxicologia de drogas e resíduos químicos. In: BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 997.
- 12 FELICI, A.; AMICOSANTE, G.; ORATORE, A.; STROM, R.; LEDENT, P.; JORIS, B.; FANUEL, L.; FRÈRE, J. M. an overview of kinectis parameters of class B β -lactamases. **Journal of Biochemistry**, v. 291, p. 151-155, 1993.

- 13 PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificações de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002.
- 14 ALEGRET, S. Biossensores: una convergencia de tecnologías avanzadas. In: YAMANAKA, H.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, M. I.; FERREIRA, A. A. P. **Biossensores eletroquímicos**. Monte Alto: Letra Boreal, 2009. p. 22-23.
- 15 ALEGRET, S.; DEL VALLE, M.; MERKOÇI, A. **Sensores electriquímicos**. Barcelona: UAB Servei de Publicacions, 2004. p. 67-94.
- 16 LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, n.6, p. 1318-1325, 2006.
- 17 OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 932-939, 2006.
- 18 FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n.1, p. 28-39, 1992.
- 19 VIEIRA, N. C. S. **Biossensores de glicose nanoestruturados baseados em dendrímeros PAMAM e filmes finos de In₂O₃:Sn**. 2006. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Materiais para Engenharia) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2006.
- 20 ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para a determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.
- 21 ZAGAL, J. H. Methallophthalocyanines as catalysts in electrochemical reactions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 119, p. 89-119, 1992.
- 22 COSTAMAGNA, J., FERRAUDI, G., CANALES, J., VARGAS, J. Carbon dioxide activation by aza-macrocyclic complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 148, p. 221-248, 1996.
- 23 ZAGAL, J.; PAES, M.; TANAKA, A. A.; SANTOS, J. R.; LINKOUS, C. Electrocatalytic activity of metal phthalocyanines for oxygen reduction. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 339, p.13-30, 1992.
- 24 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Dispõe aprovar os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 2009. Disponível em:

<www.cidasc.sc.gov.br/html/serviço_animal/Inspeção%20Animal/ORIENTA%C7%D5ES%20SOBREROTULAGEM/LEITE%20DERIVADOS/IN%2051_02_RTJ>. Acesso em: 30 nov. 2010.

25 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; FACCHINI, I.; OLIVEIRA NETO, G.; KUBOTA, L. T. Influence of gamma irradiation on a natural source of peroxidase and its effect in the reagentless amperometric biosensor for hydrogen peroxide. **Analyst**, v. 126, p. 739-742, 2001.

26 ZABORSKY, O. R. **Immobilized enzymes**. Cleveland: CRC Press, 1973. p. 26-27; 64-68.

27 RICHARDS, F. M.; KNOWLES, J. R. Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent. **Journal of Molecular Biology**, v. 37, p. 231, 1968.

28 MARTINS, L. S. P. **Monitoramento da produção de ácidos orgânicos em amostras de leite fermentado pelos grãos de Kefir e do Tibet utilizando técnicas voltamétricas e HPLC**. 2006. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências-Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

29 BUSH, K.; JACOB, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification for beta-lactamases and it's correlation with molecular structure. **ASM Journal**, v. 39, n. 6, p. 1211-1232, 1995.

30 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE n. 899: guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 maio 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 30 nov. 2010.

31 BONI, A. C.; WONG, A.; DUTRA, R. A. F.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Cobalt phthalocyanine as a biomimetic catalyst in the amperometric quantification of dypirone using FIA. **Talanta**, v. 85, p. 2067-2073, 2011.

Anexo – Resumo aceito no 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, que será realizado em Agosto de 2012.

Development of enzymatic biosensor for direct detection of penicillin in milk samples

Marcos Vinicius Foguel, Thiago Martimiano do Prado, Antonio Ap. Pupim Ferreira,
Maria Del Pilar Taboada Sotomayor
Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Rua Professor Francisco Degni, 55 - 14800-900 - Araraquara/SP – Brazil
mpilar@iq.unesp.br

This work reports by the first time a third generation biosensor for detection of penicillin, based on a gold screen printed electrode (Au-SPE) modified with penicillinase enzyme immobilized on a SAM of cystamine. The interaction with the antibiotic Penicillin G (substrate) was investigated by cyclic voltammetry (CV) and amperometry.

The construction of biosensor was performed modifying the working electrode of Au-SPEs (model AC1.W1.RS, batch Z702, BVT Technologies, Czech Republic) with 0.02 mol L⁻¹ cystamine ($t_{\text{incub}} = 2\text{h}$) and with penicillinase enzyme (100 U) immobilized on the SAM (overnight). The SPE consisted of Au-2wt.%Pd ($A_{\text{geom}} = 0.0035\text{ cm}^2$), Ag-2wt.%Pd ($A_{\text{geom}} = 0.137\text{ cm}^2$) and Au-2wt.%Pd ($A_{\text{geom}} = 0.072\text{ cm}^2$) as working, reference and auxiliary electrodes, respectively. The electrochemical measurements were carried out in 0.05 mol L⁻¹ phosphate buffer solution at pH 7.4. All experiments were repeated at least three times at 25 °C.

The first results in CV showed the increase of the reduction current from -390 mV for enzyme-substrate reaction. Then, with the aim at to perform analytical applications the applied potential was optimized, obtaining the better response at -450 mV, resulting in a calibration curve with good linear range between 4.7×10^{-4} to $4.9 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ ($R = 0.998$, $n=3$) and LOD and LOQ of 1.68×10^{-4} and $5.05 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$, respectively. It is worth mentioning that this biosensor does not require the use of electron mediators, due to that the analysis is performed by direct electron transfer between the enzyme and the substrate. In addition, is not known any biosensor for detection of penicillin, based on β -lactamase. Currently, is been analyzed the performance of this biosensor in milk samples contaminated with this antibiotic, in order to evaluate the potential of applicability of this biosensor.